



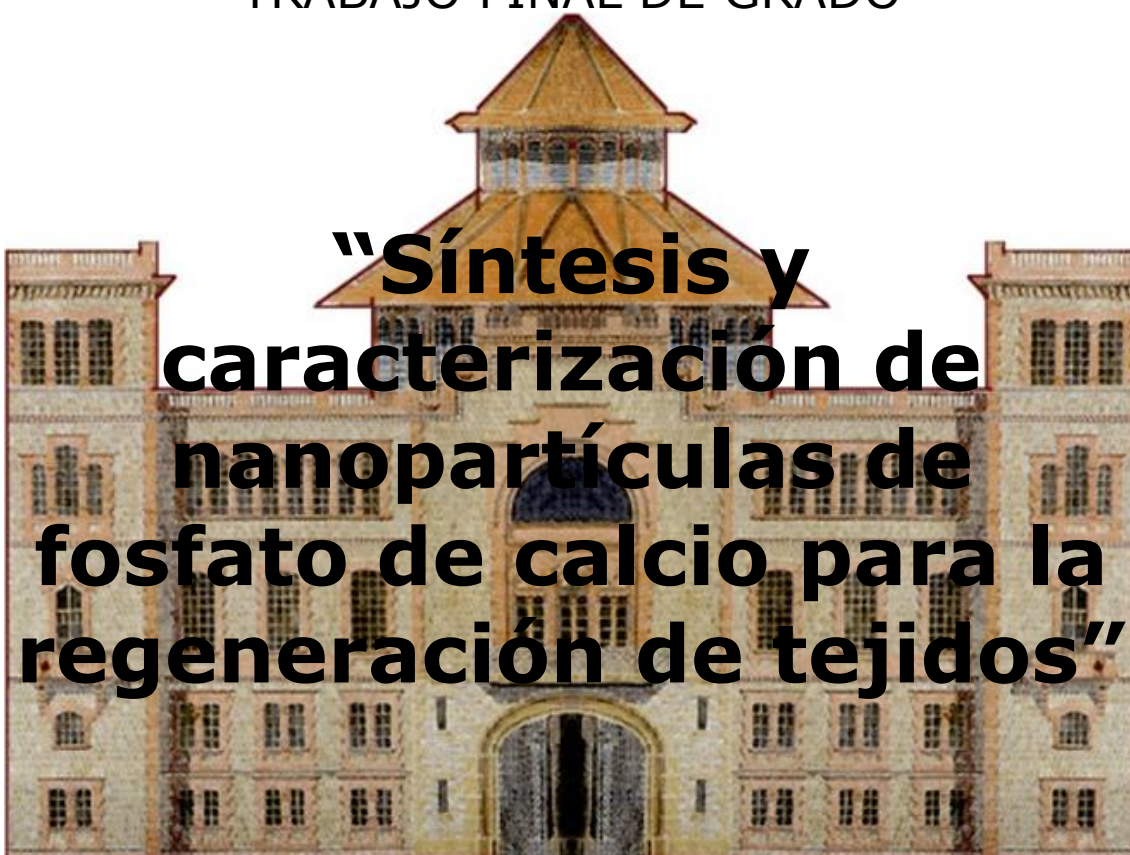
Escola Universitària d'Enginyeria
Tècnica Industrial de Barcelona
Consorci Escola Industrial de Barcelona

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA

Volumen I

Memoria – Anexos - Presupuesto

TRABAJO FINAL DE GRADO



TFG presentado para optar al título de GRADO en
INGENIERÍA BIOMÉDICA

Por **Maya Toribio Olea**

Barcelona, 11 de Junio de 2014

Director: Oscar Castaño Linares

Departamento de Ciencia de los Materiales e Ingeniería Metalúrgica (CMEM)
Universitat Politècnica de Catalunya (UPC)

ÍNDICE VOLUMEN I

| | |
|--------------------------------------------------------------------|----------|
| Índice Volumen I | 3 |
| MEMORIA..... | 6 |
| Índice memoria | 7 |
| Resum..... | 9 |
| Resumen..... | 9 |
| Abstract..... | 10 |
| Glosario..... | 11 |
| Capítulo 1: Objetivo | 12 |
| Capítulo 2: Introducción | 13 |
| 2.1. Histología del tejido óseo | 13 |
| 2.2. Propiedades mecánicas del tejido óseo | 13 |
| 2.3. Reparación y regeneración ósea | 14 |
| 2.3.1. Injertos | 15 |
| 2.3.2. Ingeniería de tejidos..... | 15 |
| 2.3.3. Fracturas | 16 |
| 2.4. Biomateriales para la regeneración ósea..... | 16 |
| 2.5. Método sol-gel | 20 |
| 2.6. Surfactantes | 21 |
| Capítulo 3: Materiales y métodos..... | 21 |
| 3.1. Síntesis de nanopartículas de fosfato de calcio | 21 |
| 3.1.1. Síntesis de los precursores..... | 22 |
| 3.1.2. Destilación de los dispersantes | 24 |
| 3.1.3. Surfactantes..... | 26 |
| 3.1.4. Preparación del catalizador básico | 26 |
| 3.1.5. Síntesis de las nanopartículas de G8 mediante sol-gel | 27 |
| 3.2. Métodos de caracterización | 31 |
| 3.2.1. Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy (EDS) | 31 |
| 3.2.2. Field Emission-Scanning Electron Microscopy (FE-SEM)..... | 32 |
| 3.2.3. Dynamic Light Scattering (DLS) | 32 |
| 3.2.4. X-ray Diffraction (XRD)..... | 33 |
| 3.2.5. Zeta Potential..... | 34 |

| | |
|-------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.2.6. Differential Scanning Calorimetry (DSC) | 34 |
| 3.2.7. Calcium release | 35 |
| 3.2.8. pH-meter | 37 |
| Capítulo 4: Resultados y discusión | 40 |
| 4.1. Composición química | 40 |
| 4.2. Morfología | 41 |
| 4.3. Tamaño..... | 46 |
| 4.4. Presencia de fases cristalinas | 51 |
| 4.5. Carga superficial..... | 54 |
| 4.6. Temperatura de transición vítrea (Tg) | 56 |
| 4.7. Liberación de calcio al medio..... | 57 |
| 4.8. pH | 61 |
| Capítulo 5: Conclusiones | 61 |
| Capítulo 6: Tratamiento de residuos..... | 63 |
| Capítulo 7: Bibliografía | 65 |
| 7.1. Referencias bibliográficas | 65 |
| 7.2. Bibliografía de Consulta | 67 |
| ANEXO I..... | 71 |
| Índice anexo I | 72 |
| I. Cálculos previos a la síntesis de G8..... | 73 |
| i. Síntesis de los precursores alcóxidos..... | 73 |
| ii. Concentración de las soluciones de los precursores..... | 73 |
| iii. Destilación de los dispersantes | 74 |
| iv. Preparación del catalizador básico..... | 75 |
| II. Cálculos para la síntesis de G8 | 76 |
| i. Volúmenes de los precursores | 76 |
| ii. Volumen del catalizador básico..... | 76 |
| iii. Volumen de los surfactantes | 77 |
| III. Cálculos para <i>calcium release</i> | 77 |
| i. Medio sin Ca ²⁺ | 77 |
| ii. Solución HCl | 78 |
| iii. AMP Buffer | 78 |
| iv. Colour reagent | 78 |
| v. Recta de calibración..... | 69 |
| vi. Liberación de liberación de calcio en el medio..... | 80 |
| ANEXO II..... | 82 |

| | |
|----------------------------------|-----------|
| Índice anexo II..... | 83 |
| I. Waste disposal (IBEC)..... | 84 |
| PRESUPUESTO | 90 |
| Índice presupuesto | 91 |
| Presupuesto..... | 93 |

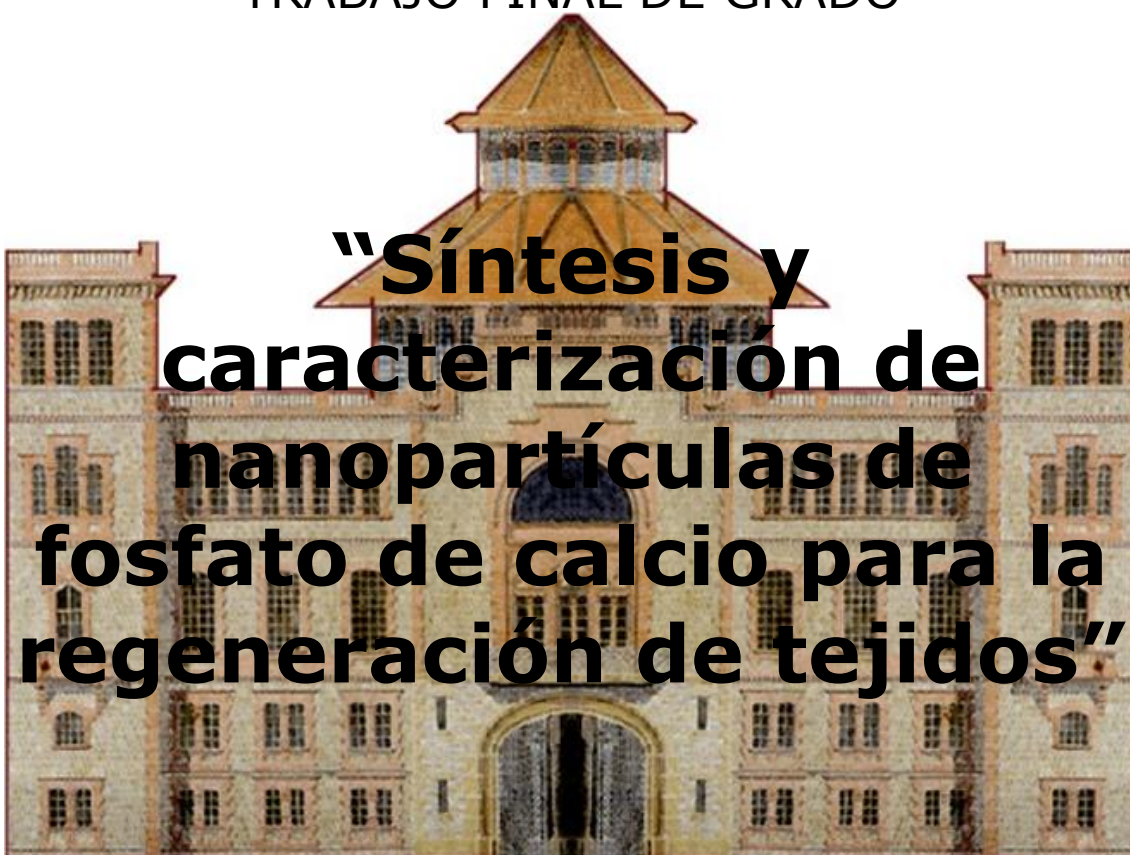


Escola Universitària d'Enginyeria
Tècnica Industrial de Barcelona
Consorci Escola Industrial de Barcelona

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA

Memoria

TRABAJO FINAL DE GRADO



TFG presentado para optar al título de GRADO en
INGENIERÍA BIOMÉDICA
Por **Maya Toribio Olea**

Barcelona, 11 de Junio de 2014

Director: Oscar Castaño Linares
Departamento de Ciencia de los Materiales e Ingeniería Metalúrgica (CMEM)
Universitat Politècnica de Catalunya (UPC)

ÍNDICE MEMORIA

| | |
|--------------------------------------------------------------------|-----------|
| Índice memoria | 7 |
| Resum..... | 9 |
| Resumen..... | 9 |
| Abstract..... | 10 |
| Glosario..... | 11 |
| Capítulo 1: Objetivo | 12 |
| Capítulo 2: Introducción..... | 13 |
| 2.1. Histología del tejido óseo | 13 |
| 2.2. Propiedades mecánicas del tejido óseo | 15 |
| 2.3. Reparación y regeneración ósea | 16 |
| 2.3.1. Injertos | 17 |
| 2.3.2. Ingeniería de tejidos..... | 17 |
| 2.3.3. Fracturas | 18 |
| 2.4. Biomateriales para la regeneración ósea | 18 |
| 2.5. Método sol-gel | 20 |
| 2.6. Surfactantes | 21 |
| Capítulo 3: Materiales y métodos | 23 |
| 3.1. Síntesis de nanopartículas de fosfato de calcio | 23 |
| 3.1.1. Síntesis de los precursores | 24 |
| 3.1.2. Destilación de los dispersantes | 26 |
| 3.1.3. Surfactantes..... | 28 |
| 3.1.4. Preparación del catalizador básico | 28 |
| 3.1.5. Síntesis de las nanopartículas de G8 mediante sol-gel | 29 |
| 3.2. Métodos de caracterización | 33 |
| 3.2.1. Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy (EDS) | 33 |
| 3.2.2. Field Emission-Scanning Electron Microscopy (FE-SEM)..... | 34 |
| 3.2.3. Dynamic Light Scattering (DLS) | 34 |
| 3.2.4. X-ray Diffraction (XRD)..... | 35 |
| 3.2.5. Zeta Potential | 36 |
| 3.2.6. Differential Scanning Calorimetry (DSC) | 36 |
| 3.2.7. Calcium release | 37 |

| | |
|--------------------------------------------------|-----------|
| 3.2.8. pH-meter | 39 |
| Capítulo 4: Resultados y discusión | 40 |
| 4.1. Composición química | 40 |
| 4.2. Morfología | 43 |
| 4.3. Tamaño..... | 48 |
| 4.4. Presencia de fases cristalinas | 51 |
| 4.5. Carga superficial..... | 56 |
| 4.6. Temperatura de transición vítrea (Tg) | 58 |
| 4.7. Liberación de calcio al medio..... | 59 |
| 4.8. pH | 61 |
| Capítulo 5: Conclusiones | 63 |
| Capítulo 6: Tratamiento de residuos | 65 |
| Capítulo 7: Bibliografía..... | 67 |
| 7.1. Referencias bibliográficas | 67 |
| 7.2. Bibliografía de Consulta | 69 |

RESUM

Les tècniques més utilitzades per a la regeneració y reparació del teixit ossi maltret, quan la seva capacitat d'auto regeneració es veu superada pel grau de lesió, tenen grans limitacions. Com per exemple, el rebuig immunològic, les complicacions d'una intervenció quirúrgica, la incapacitat de proporcionar una recuperació total de la funcionalitat del teixit o l'elevat cost econòmic. L'enginyeria tissular, una branca de la bioenginyeria en auge en els últims anys, busca complementar aquestes tècniques y solucionar els seus inconvenients.

Dintre de l'àmbit d'investigació de la regeneració òssia, una de les tècniques estudiades és la creació de materials compostos que induixin la regeneració del teixit al incorporar-les en la zona de la lesió. En aquest projecte s'han sintetitzat nanopartícules d'un vidre de fosfat de calci, modificant diferents paràmetres, amb la finalitat de trobar vies de millora en la seva estructura i funcionalitat a l'hora de formar part, com a fase inorgànica, dels materials compostos que induiran la regeneració del teixit ossi maltret. Per intentar trobar indicis de millora en els materials obtinguts, s'han utilitzat diferents mètodes per a la seva caracterització. Amb aquests mètodes s'han descartat algunes modificacions aplicades ja que no aconseguen cap tipus de millora. Per altra part, amb els resultats obtinguts en altres mostres, encara que no son concloents, sí suggereixen possibles indicis de millora amb els que seguir treballant.

RESUMEN

Las técnicas comúnmente empleadas para regenerar y reparar el tejido óseo dañado, cuando su capacidad de auto regeneración es superada por el grado de lesión, tienen grandes limitaciones. Como, por ejemplo, el rechazo inmunológico, las complicaciones de una intervención quirúrgica, la incapacidad de proporcionar una recuperación total de la funcionalidad del tejido o el elevado coste económico. La ingeniería tisular, rama de la bioingeniería en auge en los últimos años, busca complementar esas técnicas y solucionar sus inconvenientes.

Dentro del ámbito de investigación de la regeneración ósea, una de las técnicas estudiadas es la creación de materiales compuestos que induzcan la regeneración del tejido al incorporarlas en la zona de lesión. En este proyecto se han sintetizado nanopartículas de un vidrio de fosfato de calcio, modificando diferentes parámetros, con la finalidad de encontrar vías de mejora en su estructura y funcionalidad a la hora de formar parte, como fase inorgánica, de los materiales compuestos que inducirán la regeneración del tejido óseo dañado. Para intentar encontrar indicios de mejora en los materiales obtenidos, se han empleado distintos métodos para su caracterización. Con ellos se han descartado algunas de las modificaciones aplicadas por no conseguir ningún tipo de mejora con ellas. Por otra parte, con los resultados obtenidos de otras muestras, aunque

no son concluyentes, si sugieren posibles indicios de mejoría con los que seguir trabajando.

ABSTRACT

When the capacity of auto regeneration of bony tissue is exceed by the degree of the injury, techniques, usually employed to regenerate and repair the damage of this tissue, have a lot of restrictions. For example, the immune rejection, complications in surgery, the incapacity to provide a total recovery of the functionality of the tissue and the high economical cost. Tissue engineering, a branch of the bioengineering that is in growth in recent years, wants to complement those techniques and solve its disadvantages.

In the research field of bone regeneration, one of the techniques studied is the elaboration of composites that induce the regeneration of the tissue when are incorporated to the injury zone. In this project have been synthesized nanoparticles of a calcium phosphate glass, modifying different parameters, with the purpose of finding different ways to improve its structure and functionality when form part, as inorganic phase, of the composites that will induce the regeneration of the damaged bony tissue. To try to find evidences of improvements in the materials obtained, different methods of characterization have been used. With these methods some modifications have been rejected because of its lack of improvements. Otherwise, with the results obtained in other samples, although are not conclusive, it can be seen some signs of improvements to keep on working.

GLOSARIO

Agua *milliQ*: Agua purificada y desionizada en alto grado por un sistema de purificación de agua fabricado por *Millipore Corporation*.

Angiogénesis: Proceso fisiológico de formación de vasos sanguíneos a partir de los vasos preexistentes.

Colágeno tipo I: Tipo de colágeno cuya función principal es la de resistencia al estiramiento.

Efecto *Doppler*: Cambio de frecuencia de una onda producida por el movimiento relativo de la fuente respecto del observador.

Eppendorf: Tubo de plástico de microcentrífuga empleado en laboratorio.

Higroscópico: Capacidad de absorber humedad del medio circundante.

In vitro: Técnica de experimentación en un ambiente controlado fuera del organismo.

In vivo: Técnica de experimentación que tiene lugar dentro del tejido vivo.

DLS: Dispersión de luz dinámica.

DSC: Calorimetría de barrido diferencial.

EDS: Espectroscopia de rayos X de energía dispersiva.

FE-SEM: Microscopio electrónico de barrido de emisión de campo.

PLA: Ácido poliláctico.

PVA: Alcohol polivinílico.

XRD: Difracción por rayos-X.

SiO₂: Óxido de silicio.

P₂O₅: Pentóxido de fósforo.

CaO: Óxido de calcio.

TiO₂: Óxido de titanio.

EtOH: Etanol.

2-MeOEtOH: 2-metoxietanol.

C₁₂H₂₈O₄Ti: Tetraisopropóxido de titanio.

CaH₂: Hidruro de calcio.

NH₃: Amoníaco.

HCl: Ácido clorhídrico.

Ca(NO₃)₂: Nitrato d calcio.

H₃O⁺: Iones hidronio.

CAPÍTULO 1:

OBJETIVO

Actualmente existen diversas técnicas de regeneración y reparación del tejido óseo para cuando su potencial de auto regeneración es superado por el grado de lesión como consecuencia de grandes fracturas o degeneración. Todos los métodos utilizados comúnmente para este fin tienen algún tipo de inconveniente, por lo que el estudio de los biomateriales como sustituto o complemento de esas técnicas se ha convertido en un ámbito de gran interés. En los últimos años, una de las técnicas utilizadas para la regeneración del tejido óseo ha sido la creación de materiales compuestos que se puedan incorporar en la zona del tejido dañado para inducir su regeneración.

El objetivo de este proyecto ha sido sintetizar, mediante el proceso sol-gel, y caracterizar nanopartículas de fosfato de calcio que sirvan de fase inorgánica en dichos materiales compuestos liberando Ca^{2+} en el tejido dañado para inducir su regeneración. Estas nanopartículas se han intentado fabricar a partir de un vidrio de fosfato de calcio en la estructura $\text{CaO} - \text{P}_2\text{O}_5 - \text{TiO}_2$, el cual se aproxima a la fase inorgánica del hueso y es conocido por su capacidad de biodegradabilidad y su alto potencial bioactivo [1]. Con la finalidad de encontrar vías de mejora en la estructura y funcionalidad de las nanopartículas se han realizado diversas modificaciones. Variando los tiempos de duración de la etapa de envejecimiento, utilizando distintos solventes como dispersantes y añadiendo diferentes surfactantes. Una vez finalizada la fabricación de los materiales se ha procedido a la caracterización mediante distintos métodos para determinar indicios de mejoría. Con la caracterización llevada a cabo se ha determinado la composición química, la morfología, el tamaño, la presencia de fases cristalinas, la carga superficial, la temperatura de transición vítrea, la presencia de materia orgánica y el ratio de liberación de calcio en el medio.

CAPÍTULO 2:

INTRODUCCIÓN

Actualmente, en el campo de investigación de la ciencia de los biomateriales, los estudios relacionados con el tejido óseo están tomando una gran relevancia. Esto es debido en gran parte a que las enfermedades degenerativas en este tipo de tejidos, como consecuencia del continuo y creciente envejecimiento de la población, son una realidad que con el paso de los años afectará a una fracción más amplia de la población mundial.

Los tratamientos existentes para la reparación de fracturas y regeneración de estos tejidos, ya sean a causa de la degeneración o de traumatismos, son muy costosos y en muchas ocasiones insuficientes para que los pacientes puedan tener una calidad de vida óptima. Por ello existe la gran necesidad de avanzar en este ámbito de estudio. [1,2]

2.1. Histología del tejido óseo

El tejido óseo es un tipo de tejido conectivo especializado altamente vascularizado, compuesto por una fase inorgánica o mineral y una fase orgánica. Aunque sus propiedades varían a lo largo de su estructura este tejido se caracteriza por su rigidez y elevada resistencia a fuerzas tanto de tracción como de compresión. [3,4]

La organización estructural a nivel macroscópico de este tejido es la que le aporta las propiedades mecánicas que tanto le caracterizan:

- Hueso cortical o compacto: Es el tejido que forma la carpa externa de los huesos, caracterizado por su dureza, fragilidad y alta densidad. Está formado longitudinalmente por osteonas, unas estructuras cilíndricas que envuelven los canales de Havers en los que se encuentran nervios, vasos sanguíneos y linfáticos. Estos canales se conectan entre si transversalmente gracias a los conductos de Volkmann.

- Hueso trabecular o esponjoso: Este tejido está localizado en la parte interna de los huesos, caracterizado por su elevada porosidad. Está formado por una red de delgadas prolongaciones óseas, llamadas trabéculas, que están orientadas de tal modo que el hueso pueda soportar esfuerzos de tracción y compresión (figura 1). En los espacios de la red trabecular se encuentra la médula ósea roja, donde se produce la hematopoyesis.

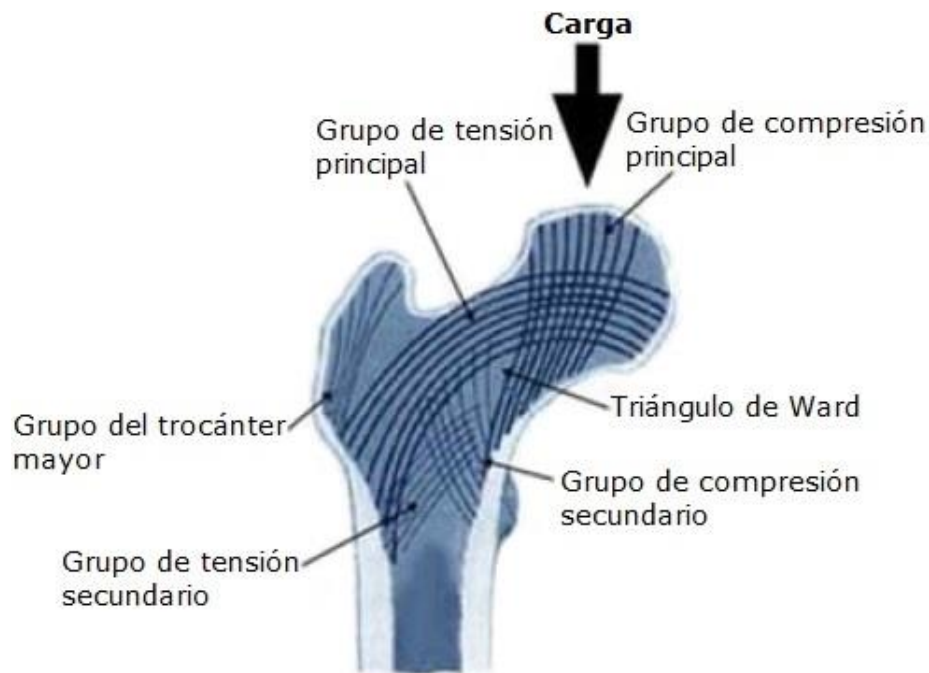


Figura 1. Disposición trabecular del hueso esponjoso. [21]

A nivel microscópico el tejido óseo se diferencia claramente en dos fases:

- Fase inorgánica o mineral: Alrededor del 65% en peso se corresponde a la fase inorgánica de este tipo de tejido constituido en su mayor parte por nanocristales de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) (figura 2).
- Fase orgánica: El 30% en peso, aproximadamente, se corresponde a la fase orgánica del tejido óseo. Está formada principalmente de una matriz de colágeno tipo I, en la que se disponen los cristales de hidroxiapatita, que da lugar a las fibras que constituyen las estructuras a nivel macroscópico. Esta fase también está formada por la parte celular y una pequeña fracción de proteínas no colágenas.

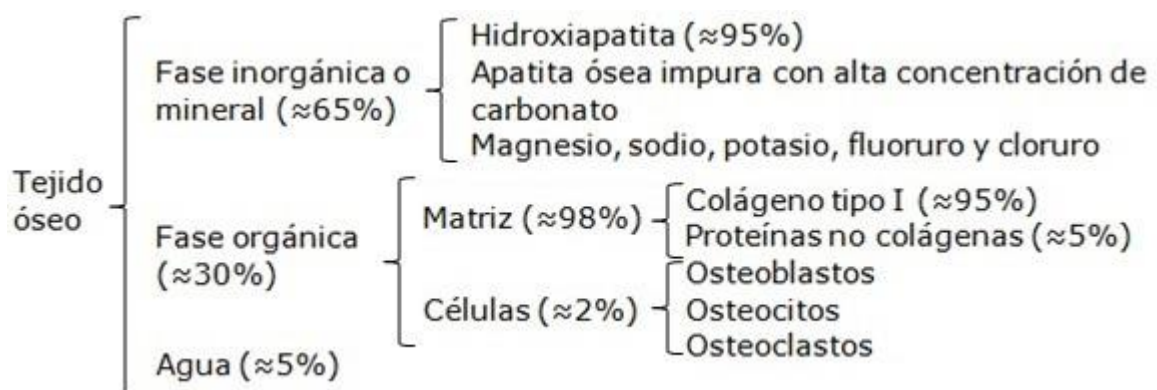


Figura 2. Fases del tejido óseo a nivel microscópico.

Aunque el tejido óseo no tiene un alto contenido celular es importante conocer la función que realizan, ya que son vitales para la correcta formación de estos tejidos. Las células óseas pueden clasificarse principalmente en [1]:

- Osteoblastos: Estas células crean el tejido óseo, ya que son las que generan la matriz ósea. En el momento en que se encuentran rodeadas de matriz se mineralizan transformándose en osteocitos.
- Osteocitos: Son el resultado de la mineralización de la membrana de los osteoblastos al finalizar su función. Residen en la matriz ósea y son las que permiten que el hueso siga siendo un tejido vivo ya que se encargan de mantener el equilibrio entre las fases inorgánica y orgánica.
- Osteoclastos: La continua regeneración del tejido óseo es posible gracias a la acción de estas células que se encargan de la reabsorción ósea y de activar la acción de los osteoblastos mediante marcadores celulares para la generación de nueva matriz ósea.

El tejido óseo cumple varias funciones en el organismo, tanto a nivel mecánico como biológico. Las funciones mecánicas principales son [5]:

- Protección: Gracias a las cavidades que forma la disposición de ciertos huesos se protegen los órganos vitales y tejidos blandos de los posibles traumatismos.
- Estabilidad y movilidad: El sistema músculo-esquelético (huesos, músculos, ligamentos y tendones) proporciona la estabilidad del cuerpo y permite su movimiento.

Algunas de las funciones biológicas que caracterizan el tejido óseo son las descritas a continuación:

- Regulación y almacenamiento: Este tejido regula el metabolismo de algunos iones (Ca^{2+} , Na^+ , Mg^{2+} , PO_4^{3-}) y contiene la mayor reserva mineral del cuerpo, sobre todo de calcio y fósforo.
- Hematopoyesis: Como se ha comentado anteriormente, en el hueso esponjoso se localiza la médula ósea roja que fabrica las células sanguíneas.

2.2. Propiedades mecánicas del tejido óseo

El hueso puede desempeñar sus funciones mecánicas resistiendo esfuerzos tanto de compresión como de tracción y de cizalladura debido a determinadas propiedades mecánicas. Cabe destacar que es un material natural anisotrópico, lo cual significa que según en qué dirección se analice se obtendrán unas propiedades u otras. También es importante tener en cuenta que, dependiendo del tiempo y de la velocidad en que se aplique la carga sobre el hueso, variarán sus propiedades mecánicas, ya que tiene un comportamiento viscoelástico. [5,6]

El equilibrio que existe en el tejido óseo, entre las fases inorgánica y orgánica, le proporcionan una combinación perfecta para soportar cargas de distintos tipos. La fase mineral se caracteriza por su elevada dureza y resistencia a esfuerzos de compresión y por su fragilidad a esfuerzos de tracción. Pero gracias a la fase

orgánica, blanda y dúctil, el hueso puede soportar esfuerzos de tracción aportándole flexibilidad y elasticidad.

Como se ha explicado en el apartado anterior, el tejido óseo se diferencia estructuralmente en dos tipos y cada uno de ellos le provee de propiedades mecánicas diferentes.

En el hueso cortical, dado que los nanocristales de hidroxapatita depositados en la matriz ósea se orientan cristalográficamente en dirección longitudinal, tiene una mayor resistencia tanto a la tracción como a la compresión en el eje longitudinal que en el eje transversal. El módulo de elasticidad también varía según la dirección en que se aplique la carga. En la tabla 1 se resumen algunos de los valores de las propiedades mecánicas del hueso obtenidos a partir de ensayos. Cabe destacar que dichos valores varían mucho en función de la condiciones de ensayo, los puntos de aplicación de las cargas entre otros parámetros. [4]

Tabla 1. Propiedades mecánicas del hueso cortical. [4]

| | Resistencia compresión (MPa) | Resistencia a tracción (MPa) | Módulo elasticidad (GPa) | Resistencia cizalladura (MPa) | Módulo cizalladura (GPa) |
|---------------------|------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|
| Eje longitudinal | 131-224 | 78,8-151 | 17-20 | 53,1-70 | 3,3 |
| Eje transversal | 106-133 | 51-56 | 6-13 | | |

Las propiedades mecánicas referentes al hueso trabecular dependen tanto de su densidad que hace muy difícil su estudio y su rango de variación es muy extenso. A pesar de ello, ciertos ensayos han demostrado que su resistencia a la compresión es de 5-10 MPa y su módulo de elasticidad de 50-100MPa [5].

2.3. Reparación y regeneración ósea

El tejido óseo, gracias a su alta vascularización y a las células que lo forman, tiene una gran capacidad de regeneración. Tanto en la continua renovación durante su desarrollo como en respuesta a algún tipo de traumatismo o lesión. La regeneración del tejido óseo, al igual que cualquier otro tejido, no solo implica la reparación de su estructura sino también el restablecimiento de sus funciones a nivel bioquímico, metabólico y biomecánico. [6]

En ocasiones el nivel de defecto del tejido óseo supera su capacidad de auto-regeneración debido al tamaño de la lesión como consecuencia de grandes fracturas, degeneración del tejido por osteoporosis o necrosis, infecciones, tumores, entre otros. Por ello existen diversas técnicas de reparación y regeneración ósea con las que se intenta alcanzar el máximo nivel de recuperación posible tanto de su estructura como de su funcionalidad.[5,7]

A continuación se describen brevemente algunas de las técnicas de reparación y regeneración ósea existentes. [1,2,6]

2.3.1. Injertos

Una de las técnicas más utilizadas en la regeneración del tejido óseo es la utilización de injertos, es decir, el reemplazo de un hueso o parte de él mediante un proceso quirúrgico para reparar ciertos tipos de lesiones. Dichos injertos pueden clasificarse en tres grupos distintos en función de su origen.

- Autoinjertos: Se trata de un trasplante en el que se extrae un fragmento de hueso del propio individuo para luego implantárselo en el punto de la lesión. Aunque es el caso de injerto de más éxito debido a que no presenta rechazos inmunológicos produce ciertas desventajas a tener en cuenta. Al tener que realizar dos operaciones quirúrgicas el procedimiento se vuelve más costoso, más peligroso para el paciente por posibles infecciones y la rehabilitación resulta más larga y dolorosa. Además la cantidad de tejido de la que se puede disponer es limitada.
- Alloinjertos: Este trasplante se diferencia de los autoinjertos en el donante, ya que en este caso el tejido proviene de un individuo humano diferente al paciente, generalmente de uno fallecido recientemente. Este tipo de injerto evita la segunda intervención quirúrgica, pero en su lugar presenta un posible rechazo inmunológico y transmisión de posibles patógenos. Para intentar evitar estos efectos el tejido es sometido a diversos tratamientos antes de ser trasplantado. Además sigue existiendo la limitación de la disponibilidad de un donante.
- Xenoinjertos: Se basa en trasplantar un fragmento de hueso de origen animal. Aunque con esta técnica no hay limitación en cuanto a la disponibilidad de tejido donante hay un gran inconveniente ya que existe un alto riesgo de transmisión de enfermedades infecciosas y, obviamente, un alto riesgo de rechazo inmunológico.

2.3.2. Ingeniería de tejidos

La ingeniería de tejidos, ingeniería tisular o medicina regenerativa se define como el campo de la bioingeniería que estudia la regeneración o sustitución de tejidos y órganos combinando los principios y métodos de la ingeniería con los de la biomedicina.

Las recientes técnicas que han surgido en estas últimas décadas relacionadas con esta área buscan solución a las limitaciones de los tratamientos anteriormente descritos y, a la vez, mejorarlos. Gracias a la tecnología actual pueden simularse las condiciones fisiológicas del organismo de modo que se puedan crear y manipular tejidos in vitro para luego aplicarlos en el organismo. Actualmente existen varias tendencias de trabajo dentro de la ingeniería tisular que pueden definirse como:

- Estrategia I: Consiste en crear y hacer proliferar tejidos in vitro hasta su implantación en el organismo para sustituir tejidos dañados.
- Estrategia II: Se trata de crear andamios con materiales naturales o biosintéticos que contengan células aisladas del donante in vitro, para luego implantarlas en el paciente y promover la regeneración del tejido dañado.

- Estrategia III: Se basa en introducir biomateriales bioactivos en el tejido dañado para inducir su regeneración. Este proyecto se encuentra dentro de esta estrategia de la ingeniería de tejidos.

2.3.3. Fracturas

En el caso de fracturas óseas es necesario utilizar algún tipo de sostén mecánico para inmovilizar el hueso y asegurar la correcta reparación de la rotura y para transmitir las cargas durante dicho proceso. Estos soportes pueden complementarse con o sin el uso de algún tipo de biomaterial que promueva la regeneración del tejido, por ejemplo. Algunos de los fijadores más empleados se describen brevemente a continuación:

- Placas de osteosíntesis: Estos dispositivos mecánicos son fijados en contacto con el hueso con la ayuda de tornillos y sirven de guía para la correcta reparación de la fractura. Actualmente son el soporte más utilizado para este tipo de lesiones.
- Clavos intramedulares: Estos soportes se implantan en el canal medular de los huesos largos. Tienen la ventaja de proporcionar resistencia a la flexión pero, por el contrario, no a la torsión.

2.4. Biomateriales para la regeneración ósea

Según el *Second Consensus Conference on Definitions in Biomaterials* (Chester, UK, 1991), un biomaterial es un material diseñado y desarrollado para estar en contacto con el cuerpo humano con el objetivo de evaluar, mejorar o sustituir cualquier tejido, órgano o función de un ser vivo. [10]

Para cualquier biomaterial el primer requisito que debe cumplir es que sea biocompatible, en este caso para los empleados en la ingeniería de tejidos.

Según Williams (2008), la biocompatibilidad se define como la capacidad de un biomaterial para llevar a cabo la función deseada en una terapia médica, sin provocar efectos locales o sistémicos indeseables en el receptor o beneficiario de la terapia, generando siempre la respuesta celular o del tejido más adecuada en esa situación específica, y optimizando clínicamente el rendimiento de la terapia. [9]

Este requisito es indispensable ya que, de no ser así, al aplicar los materiales en los tejidos del cuerpo humano surgirían fenómenos de toxicidad o de rechazo que podrían provocar trombosis o coagulaciones en la sangre. En cambio, si un material es biocompatible y cumple otros requisitos como no ser tóxico, ni cancerígeno puede ser beneficioso en los procesos de las células de los tejidos que lo rodean. [8]

Podemos encontrar una gran diversidad de biomateriales en el campo de la regeneración de tejido óseo, entre las cuales destacan ciertos metales, cerámicas, biovidrios, polímeros y materiales compuestos. Actualmente dichos biomateriales pueden clasificarse de formas distintas, en función de que parámetros se quieran tener en cuenta. A continuación se clasificarán según la respuesta bioquímica del tejido al entrar en contacto con ellos. [10, 11]

- Reabsorbibles: Este tipo de biomateriales son capaces de degradarse de tal forma que sean eliminados o metabolizados por el organismo cierto tiempo después de ser implantados. Su propósito es que sean reemplazados por el propio tejido óseo que se vaya regenerando. Pero tienen un inconveniente, ya que es necesario que exista una correlación entre la velocidad de reabsorción del material y la velocidad en que se regenera el tejido óseo y dicha correlación no siempre se da. Dentro de esta categoría podemos encontrar polímeros biodegradables y ciertas cerámicas.
- Bioactivos: Los biomateriales de este grupo provocan una respuesta biológica en la superficie del material haciendo que se formen enlaces directos entre su superficie y el tejido óseo, es decir, sin que se forme tejido conectivo entre ellos. Se pueden clasificar en este grupo algunas cerámicas, vitro-cerámicas y biovidrios.
- Bioinertes: En esta categoría se encuentran aquellos biomateriales que son muy resistentes a la corrosión y no reaccionan con el medio al ser implantadas, manteniendo sus propiedades mecánicas y físicas. En consecuencia, se forma una cápsula fibrosa entre la superficie del biomaterial y los tejidos en contacto con el mismo. En este grupo se encuentran algunas cerámicas.

Como ya se ha comentado anteriormente existe una gran variedad de biomateriales empleados en el ámbito de la regeneración ósea, pero a continuación solo se describirán con más detalle los biovidrios, dado que el objetivo de este proyecto se centra en la síntesis y caracterización de biovidrios de fosfato de calcio.

Los biovidrios pueden clasificarse de forma general en los de base de SiO_2 y los de base de P_2O_5 . En los años 70 Hench empezó a estudiar un biovidrio de base de SiO_2 con una composición determinada. Actualmente sigue siendo el biovidrio más empleado en aplicaciones médicas y es el comercialmente conocido como Bioglass® 45S5. Su composición específica (en porcentajes en peso) es 45% SiO_2 , 24,5% CaO , 24,5 Na_2O , 6% P_2O_5 . Este biovidrio tiene la ventaja de tener una gran capacidad de integración ósea de tal manera que, al introducirlo en una zona donde existe una gran lesión, le permite aumentar la regeneración y proveer soporte estructural al unirse fuertemente al tejido óseo. Por el contrario, se ha demostrado que su tasa de reabsorción generalmente suele ser demasiado baja. En los años 80 Burnie y Gilchrist introdujeron un nuevo tipo de biovidrios, los basados en P_2O_5 para aplicaciones clínicas. Con ellos se logra una mayor aproximación a la composición de la fase inorgánica del tejido óseo aunque su mayor ventaja es la posibilidad de modificar su velocidad de degradación en según la finalidad que se necesite. Para ello debe variarse la composición química del sistema vítreo. [12, 13, 15]

Los biovidrios basados en P_2O_5 , en este caso de fosfato de calcio, tienen una elevada solubilidad que, variando su composición química, puede modificarse para controlar la velocidad de degradación tal y como ya se ha comentado. Gracias a esta característica tienen un gran interés dentro del ámbito de la regeneración ósea, ya que de esta manera se pueden ir degradando progresivamente reduciendo sus propiedades de soporte mecánico durante la reparación del tejido.

El vidrio basado en P_2O_5 es un material amorfo, resultado de las configuraciones tetraédricas de fósforo (PO_4) unidas mediante enlaces covalentes a través de los oxígenos puentes que forman largas cadenas. Con ello se obtiene la unidad estructural de la red vítrea tridimensional del material. Esta red vítrea puede reforzarse incorporando ciertos iones, ya que se crearían enlaces iónicos entre oxígenos no enlazados de diferentes cadenas. Generalmente a los biovidrios de fosfato se les incorpora CaO , Na_2O y TiO_2 . Con ellos se puede controlar la velocidad de degradación (al modificarse la solubilidad) y las propiedades mecánicas. Con la adición del CaO se ajusta la composición del vidrio a la de la fase mineral del hueso, la hidroxiapatita ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$), y con la adición del TiO_2 se estabiliza su estructura ya que los iones de Ti^{4+} generan enlaces covalentes resistentes a la hidrólisis. [4, 15]

Para demostrar la biocompatibilidad del biovidrio de fosfato con composición variable de $P_2O_5 - CaO - Na_2O - TiO_2$ se han realizado ensayos con células (fibroblastos de piel humana y osteoblastos). Con ellos se ha podido concluir que ni este biovidrio ni sus productos de degradación son citotóxicos. Ciertos estudios de diferenciación celular revelan que el vidrio impulsa una diferenciación temprana de osteoblastos, con lo cual la regeneración del tejido óseo podría ser más rápida. Ensayos in vivo confirman que el vidrio es biocompatible y que tiene un elevado potencial osteoconductor [15, 16]. Además, ciertos estudios revelan que este tipo de vidrio es un promotor angiogénico eficaz, con lo que se promueve la vascularización del tejido dañado favoreciendo su regeneración [17].

2.5. Método sol-gel

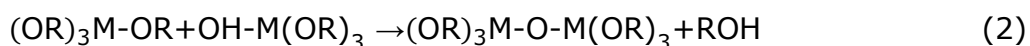
El método sol-gel es una técnica de síntesis de materiales cerámicos que mediante la preparación de una suspensión coloidal (sol) y la gelación del sol se forma una red dentro de una fase líquida continua (gel).

En el caso de sintetizar el vidrio de fosfato de calcio llamado G8 con composición $P_2O_5 - CaO - TiO_2$, los precursores para la suspensión coloidal son alcóxidos. Estos precursores alcóxidos reaccionan fácilmente con el agua, generando procesos de hidrólisis y condensación. Estas reacciones pueden llegar a controlarse en función del tipo de catalizador, el uso o no de surfactante y la cantidad de agua que se introduzcan en el proceso. Con ello se consigue variar la morfología y el tamaño del vidrio según convenga. [15, 16, 18, 19]

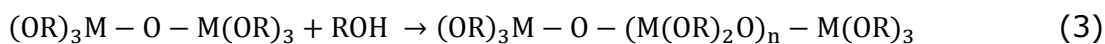
Al mezclar todos los alcóxidos, a falta del catalizador, se producen una serie de reacciones de hidrólisis y condensación. Luego, los alcóxidos reaccionan con las moléculas de agua presentes en el catalizador de la siguiente forma (1):



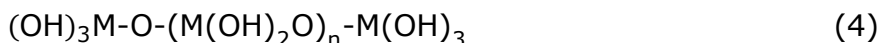
Los alcóxidos hidrolizados parcialmente reaccionan entre ellos mediante condensación según (2):



Durante la etapa de envejecimiento, en la que se mantiene una temperatura constante durante cierto tiempo, los grupos $(OR)_3M-O-M(OR)_3$ formados reaccionan entre sí a partir del grupo OH (3) creando una gran red:



Finalmente se obtiene este vidrio (4) en el que los metales (M) se sustituirían alternativamente por los átomos de P, Ca y Ti y los radicales (R) por grupos OH de los propios solventes de las soluciones de los precursores alcóxidos:



2.6. Surfactantes

Los surfactantes o tensioactivos son compuestos que modifican la superficie de contacto entre dos fases alterando la tensión superficial. Son moléculas anfifílicas, lo cual significa que tienen dos partes diferenciadas en su estructura. La cabeza es hidrófoba (insoluble en agua) y la cola es hidrófila (soluble en agua), tal y como se muestra en la figura 3. Los surfactantes pueden clasificarse según su potencial de disociación ante un electrolito y sus propiedades fisicoquímicas: [22]

- No iónicos: Se diferencian del resto por no disociarse en iones en contacto con un medio acuoso ya que no incluyen grupos funcionales ionizables en su estructura. Su parte hidrófila suele ser un grupo alcohol o éter y la hidrófoba una cadena alifática.
- Aniónicos: Su parte hidrófila posee un grupo funcional con carga negativa que suele ser un grupo carboxilato, sulfonato, sulfato o fosfato. Para que a molécula sea neutra se asocian a un catión.
- Catiónicos: Su parte hidrófila posee un grupo funcional con carga positiva que suele ser un grupo amonio cuaternario. Para neutralizar la molécula se asocian a un anión de grupos alquilo diferentes.
- Anfóteros: Su parte hidrófila posee tanto un grupo funcional con carga negativa (generalmente un grupo carboxilato) como un grupo funcional con carga positiva (generalmente un grupo amonio cuaternario). Además la parte hidrófoba suele tener un grupo alquilo. Además la carga de los surfactantes anfóteros cambian en función del pH.

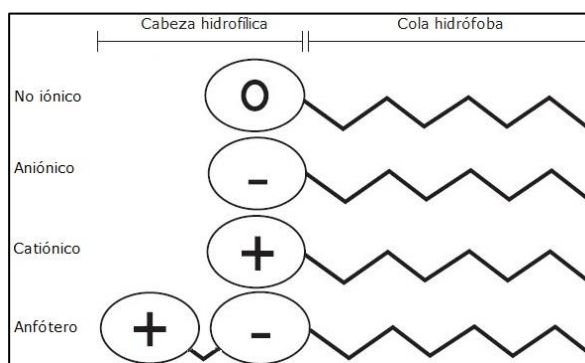


Figura 3. Clasificación de los diferentes tipos de

Una de las características más importantes de un surfactante es la concentración micelar crítica (CMC), es decir, la concentración mínima necesaria de cada

surfactante para que se originen micelas en la solución. Es un parámetro a tener en cuenta ya que la tensión superficial varía en gran medida antes de alcanzar el CMC pero una vez superada esta concentración de surfactante la tensión se mantiene constante o aumenta levemente. [20]

Como se ha explicado en el apartado anterior (2.5), una forma de modificar la morfología y tamaño de las nanopartículas resultantes del método sol-gel es añadiendo surfactantes. Al introducir en el sistema sol-gel las moléculas de surfactante éstas se orientan de tal modo que crean agregados con la cola hidrófoba en los extremos en contacto con el solvente apolar y la cabeza orientada en el centro (figura 4). Al añadir agua en el sistema los agregados de surfactante se expanden desde el centro, quedando las moléculas de agua y las nanopartículas contenidas entre las cabezas hidrófilas. [19, 21]

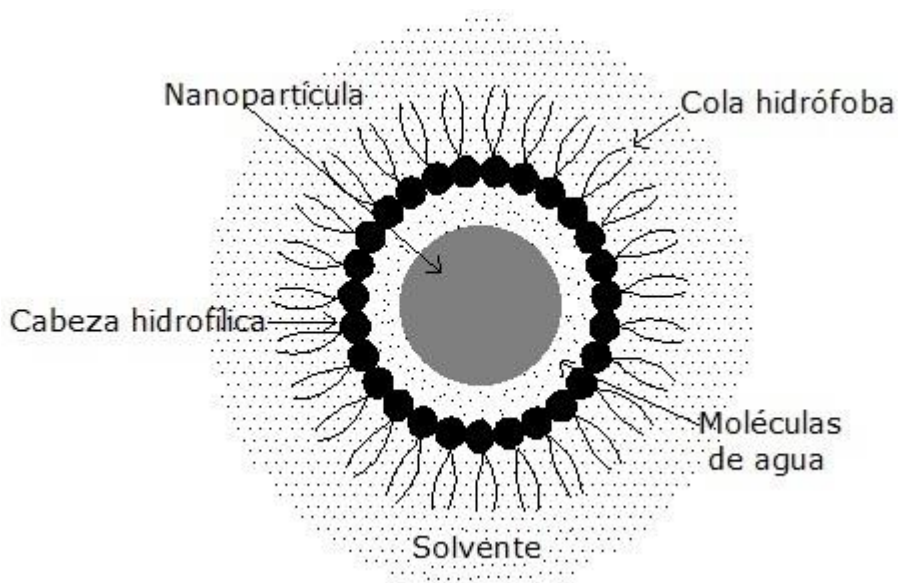


Figura 4. Estructura de micelas invertidas. [17]

CAPÍTULO 3:

MATERIALES Y MÉTODOS

En este capítulo se describen los materiales utilizados para la síntesis de las nanopartículas, la metodología seguida durante los procedimientos y los equipos empleados para la caracterización de los productos obtenidos.

3.1. Síntesis de nanopartículas de fosfato de calcio

En este trabajo se ha utilizado un vidrio de fosfato de calcio con el sistema P_2O_5 – CaO – TiO_2 para la síntesis de las nanopartículas. En estudios previos en el que se ha tratado este tema [1, 16, 24, 25], y tal como se ha descrito en el apartado 2.4, se suele introducir también Na_2O en la composición de este biovidrio. Pero debido a que su aportación no es tan clara como la del CaO y el TiO_2 se ha optado por no utilizarlo.

Empleando el método sol-gel, ya explicado en el apartado 2.5, se han querido obtener nanopartículas de biovidrio de fosfato de calcio con la composición química en porcentaje molar 36% P_2O_5 – 56% CaO – 8% TiO_2 . Este vidrio es conocido como G8 por el porcentaje molar específico del TiO_2 .

Para la elaboración de las nanopartículas con la composición antes detallada, los volúmenes utilizados de los tres precursores alcóxidos siempre ha sido el mismo, al igual que el volumen y tipo de catalizador básico (H_2O – NH_3 – $EtOH$) y la temperatura durante la etapa de envejecimiento ($70^\circ C$). Además siempre se ha mantenido la proporción de 5% G8 y 95% de dispersante. En cambio, se han ido variando ciertos parámetros para estudiar su efecto en el resultado final. En este proyecto se ha querido estudiar el efecto de la duración de la etapa de envejecimiento, la utilización de diferentes dispersantes (dado que en estudios previos [1, 16, 24, 25] siempre se ha usado el mismo, el 1,4-dioxano) y la adición de surfactantes. De los productos obtenidos se han analizado distintas características como la morfología, tamaño, carga superficial, presencia de

materia orgánica o el ratio de liberación de calcio, para intentar conocer de qué manera y en qué grado les influyen las variaciones aplicadas. En la tabla 2 se describe la nomenclatura de los experimentos realizados y sus parámetros:

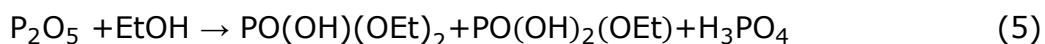
Tabla 2. Descripción de los experimentos de G8

| | Tiempo (días) | Dispersante | Surfactante |
|-------------|------------------|-------------|-----------------------|
| G8(2.D) | 2 | 1,4-dioxano | - |
| G8(4.D) | 4 | 1,4-dioxano | - |
| G8(6.D) | 6 | 1,4-dioxano | - |
| G8(4.A) | 4 | Acetona | - |
| G8(4.Ac) | 4 | Aceite | - |
| G8(4.C) | 4 | Ciclohexano | - |
| G8(4.T) | 4 | Tolueno | - |
| G8(4.D.TX) | 4 | 1,4-dioxano | Triton® X-100 |
| G8(4.D.TW) | 4 | 1,4-dioxano | Tween® 20 |
| G8(4.D.PVA) | 4 | 1,4-dioxano | Alcohol de polivinilo |

3.1.1. Síntesis de los precursores

Para obtener las nanopartículas de vidrio de fosfato de calcio con el sistema P_2O_5 – CaO – TiO_2 es necesario preparar previamente las soluciones de los precursores alcóxidos. Los procedimientos que se han seguido para su elaboración son los descritos a continuación:

- Solución de P_2O_5 : Los reactivos empleados son P_2O_5 al 99% y EtOH destilado. La reacción que se produce es la siguiente (5):



Como el polvo de P_2O_5 es altamente higroscópico (reacciona con la humedad del ambiente) debe utilizarse una bolsa de guantes herméticamente cerrada y purgada hasta que el higrómetro marque un punto de rocío de $-20^\circ C$ ($\sim 0,8 g/m^3$ de agua) para introducir en un balón de vidrio la cantidad necesaria de P_2O_5 y un agitador. Cerrar el balón con un tapón de vidrio y un septum.

Preparar dentro de la campana de gases el montaje para dejar la solución a reflujo, siendo rápidos en el momento de conectar el tubo refrigerador al balón de vidrio, realizando las purgas (vacío, argón). Poner en un baño de hielo el balón de vidrio (figura 5) mientras se introduce muy lentamente con una jeringuilla el volumen necesario de EtOH destilado, ya que la reacción es muy exotérmica. Luego sustituir el baño de hielo por una base metálica que ayude a homogeneizar el calentamiento (figura 6). Dejar a

reflujo 24 horas a 220°C aproximadamente con agitación constante y en atmósfera inerte (dejar la válvula de argón abierta).

Pasadas las 24 horas sacar con la ayuda de una jeringuilla la solución del balón e introducirlo en un vial limpio, sellado y purgado. Utilizar un filtro entre la jeringuilla y la aguja para eliminar residuos de la solución. Finalmente envolver el vial en papel de aluminio y guardar en el congelador.

Según la cantidad de P_2O_5 y el volumen de EtOH destilado que se ha calculado (ver anexo I) la solución obtenida deberá tener una concentración aproximada de 2M.

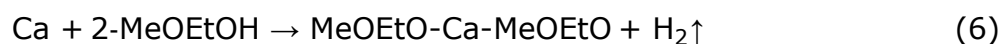


Figura 5. Baño de hielo mientras se introduce el EtOH destilado.



Figura 6. Montaje para dejar la solución a reflujo

- Solución de CaO: Los reactivos empleados son Ca metálico al 99% y 2-MeOEtOH al 99,8%. La reacción que se produce es la siguiente (6):



Introducir en un balón de vidrio la cantidad necesaria de Ca metálico y un agitador. Preparar dentro de la campana de gases el montaje para dejar la solución a reflujo (figura 5), acoplando un tubo refrigerador al balón de vidrio y colocándolo encima de una base metálica para homogeneizar el calentamiento. Purgar el sistema y dejar abierta la válvula de argón para que todo el proceso se realice en atmósfera inerte. Introducir en el balón el volumen necesario de 2-MeOEtOH con la ayuda de una jeringuilla, luego calentar los reactivos hasta, aproximadamente, 134°C y dejarlos a reflujo durante 12-24 horas con agitación constante en atmósfera inerte.

Transcurrido el tiempo de reflujo se saca con la ayuda de una jeringuilla la solución del balón de vidrio y se introduce en un vial limpio, sellado y purgado. Es necesario filtrar la solución del mismo modo que la de P_2O_5 , como ya se ha descrito. También se envuelve el vial en papel de plata y se conserva en el congelador.

Conforme la cantidad de Ca metálico y el volumen de 2-MeOEtOH que se ha calculado (ver anexo I) la solución obtenida deberá tener aproximadamente una concentración de Ca^{2+} de 1M.

- Solución de TiO_2 : La dilución se prepara con $C_{12}H_{28}O_4Ti$ (isopropóxido de titanio) al 95% y EtOH destilado.

El isopropóxido de titanio es altamente higroscópico, con lo cual se debe utilizar una bolsa de guantes herméticamente cerrada y purgada hasta que el higrómetro marque $-20^\circ C$ para introducir con la ayuda de una pipeta el volumen necesario de $C_{12}H_{28}O_4Ti$ en un matraz aforado que luego debe sellarse con un septum. Purgar el matraz e introducir con la ayuda de una jeringuilla el volumen necesario de EtOH destilado. Agitar suavemente para mezclar los reactivos, ya que se trata de una reacción exotérmica.

Luego traspasar la solución a un vial limpio, sellado y purgado con la ayuda de una jeringuilla mientras se filtra tal y como en los dos casos anteriormente explicados. Envolver el vial con papel de plata y, en este caso, guardar a temperatura ambiente.

Según el volumen de $C_{12}H_{28}O_4Ti$ y de EtOH destilado que se ha calculado (ver anexo I) la solución obtenida deberá tener aproximadamente una concentración de Ti^{4+} de 2M.

La concentración real de la solución de P_2O_5 no se pudo conocer, ya que no teníamos el equipo requerido para ello. Por lo tanto, para los cálculos de los volúmenes necesarios para la síntesis de las nanopartículas se supuso la concentración teórica 2M. En el caso de las soluciones de CaO y de TiO_2 sí se pudo conocer la concentración real mediante el proceso de termogravimetría (anexo I), con el que se obtuvieron las concentraciones de $[Ca^{2+}] = (1,17 \pm 0,06)M$ y $[Ti^{4+}] = (2,08 \pm 0,01)M$.

3.1.2. Destilación de los dispersantes

Como dispersante en la síntesis de las nanopartículas mediante el método sol-gel se han utilizado diferentes sustancias. Como ya se ha explicado (2.5) este proceso debe suceder en ausencia de agua hasta el momento de introducir el catalizador (el cual incorpora una fracción de agua). Por ello algunos de los dispersantes fueron destilados, cuyo protocolo se describe a continuación. Los cálculos correspondientes se encuentran en el anexo I.

- 1,4-dioxano: Esta sustancia ($C_4H_8O_2$) es un solvente orgánico polar aprótico, miscible en etanol. Su temperatura de fusión es $11,8^\circ C$ y la de ebullición $101^\circ C$. [24] Gracias a estudios previos [1, 24, 25], se conoce que no disuelve las nanopartículas y además ayuda a limitar su tamaño.

El reactivo necesario para destilarlo es el CaH_2 (hidruro de calcio). En un balón de vidrio se introduce un agitador, la cantidad calculada de CaH_2 y el

volumen de 1,4-dioxano a destilar. Dentro de la campana de gases se prepara el montaje (figura 7) para dejar a reflujo el dispersante, acoplando el destilador (previamente purgado) al balón de vidrio y colocando una base metálica para que el calentamiento sea homogéneo. Se deja el dispersante a reflujo 24 horas a 110°C con agitación constante.

Transcurrido el tiempo de reflujo, se acopla al destilador un balón con zeolitas (figura 8), previamente secadas a 120°C durante 24 horas, que evitan la absorción de humedad por parte del 1,4-dioxano destilado. Se cubre con papel el balón con el dispersante para favorecer su evaporación. Una vez recogido todo el 1,4-dioxano destilado en el balón con zeolitas, éste se sella y purga para guardarlo a temperatura ambiente.

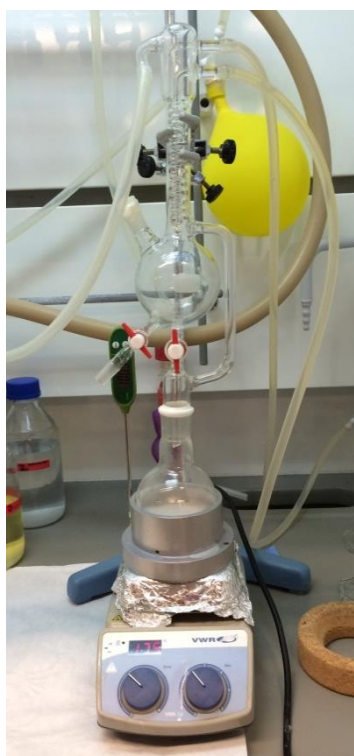


Figura 7. Montaje para dejar el dispersante a reflujo



Figura 8. Montaje para la destilación del dispersante.

- Acetona: Este compuesto químico (C_3H_6O) es un solvente polar aprótico miscible en etanol que se evapora con gran facilidad. Su temperatura de fusión es a -95°C y la de ebullición a 56°C. [27]

Para destilar la acetona se emplea el mismo método que para la destilación del 1,4-dioxano. La única diferencia es la temperatura de reflujo y destilación que sería aproximadamente 65°C, ya que la temperatura de ebullición de esta sustancia es mucho más baja.

- Aceite de oliva: Su principal componente es un tipo de ácido graso monoinsaturado, el ácido oleico ($C_{18}H_{34}O_2$). Es una sustancia apolar inmiscible en etanol. Por debajo de los 10°C empieza a gelificarse y su temperatura de ebullición es de 190°C. No es necesario destilarlo, ya que el aceite comercial no contiene apenas agua.

- Ciclohexano: Este compuesto químico (C_6H_{12}) es un solvente apolar inmiscible en etanol. Su temperatura de fusión es de $7^{\circ}C$ y la de ebullición $81^{\circ}C$. [28]

El método de destilación es el mismo que ya se ha explicado pero variando la temperatura de reflujo y destilación que es aproximadamente $90^{\circ}C$, ya que la temperatura de ebullición del ciclohexano es más baja.

- Tolueno: Esta sustancia ($C_6H_5CH_3$) es un solvente apolar inmiscible en etanol. La temperatura de fusión del cual es de $-95^{\circ}C$ y la de ebullición de $110,6^{\circ}C$. [29]

Para su destilación se utilizaría el mismo que con los compuestos anteriores, aumentando la temperatura de reflujo y destilación a $120^{\circ}C$. Aunque para su uso en este proyecto no fue necesario destilarlo, ya que el tolueno que se utilizó ya estaba libre de agua garantizado por el suministrador.

3.1.3. Surfactantes

Tal y como ya se ha comentado, se han sintetizado tres muestras de nanopartículas de fosfato de calcio incorporando surfactantes. Con ello, se ha querido analizar si su agregación durante el proceso influía de algún modo en la morfología, tamaño y otros aspectos de dichas partículas. Los surfactantes empleados han sido los siguientes:

- Triton® X-100: Se trata de un surfactante no iónico biodegradable en ciertas condiciones. Es muy utilizado como agente humectante y emulsionante. [20, 31]

Durante el proceso de síntesis de las nanopartículas, se añadió directamente el volumen calculado (anexo I) del compuesto comercial.

- Tween® 20: Conocido también como polisorbato 20, es un surfactante no iónico muy utilizado como emulsionante en el campo farmacológico debido a su relativa ausencia de toxicidad. [32]

Como en el caso anterior, el volumen necesario de este surfactante fue incorporado directamente del compuesto comercial durante la síntesis.

- Alcohol polivinílico (PVA): Es un surfactante polimérico no iónico de origen sintético. Es soluble en agua, completamente biodegradable y carece de toxicidad. [31]

Para poder añadirlo a la solución donde se estaban sintetizando las nanopartículas hubo que preparar una solución de PVA con agua (anexo I). Dado que el método utilizado tiene que suceder en ausencia de agua hasta el momento de agregar el catalizador básico, se esperó a tener éste totalmente incorporado para introducir la solución del surfactante.

3.1.4. Preparación del catalizador básico

El catalizador básico empleado en este proyecto para la síntesis de las muestras de G8 está compuesto de agua, amoníaco y etanol absoluto con la relación molar

$60\text{H}_2\text{O} : 0,3\text{NH}_3 : 12\text{EtOH}$. Los volúmenes necesarios para su preparación están detallados en el anexo I.

Para su preparación simplemente hay que mezclar en un vial de vidrio el volumen necesario de agua *milliQ*, EtOH absoluto y NH_3 . Hay que tener en cuenta que el compuesto resultante pierde su capacidad de catálisis con el transcurso del tiempo debido a la evaporación del amoníaco, por lo tanto no se puede utilizar pasada una semana desde su elaboración.

3.1.5. Síntesis de las nanopartículas de G8 mediante sol-gel

El protocolo de síntesis para las nanopartículas de G8 se ha modificado en ciertos aspectos del de [16]. A continuación se describe el procedimiento utilizado para la síntesis de las muestras G8(2.D), G8(4.D) y G8(6.D), ya que entre ellas solo difieren en el tiempo de duración de la etapa de envejecimiento. Para la síntesis del resto de muestras se realizaron ciertas variaciones de este protocolo que se explicarán más tarde. Todos los cálculos para los volúmenes utilizados de los precursores, dispersantes, surfactantes y catalizador se especifican en el anexo I.

1. Sacar del congelador la solución que contiene el precursor de Ca y dejarlo en un baño de ultrasonidos durante 10 minutos mínimo para que se dispersen los posibles precipitados.
2. Realizar el montaje que se muestra en la figura 9 dentro de la campana de gases, asegurando que todo el sistema quede bien sellado para evitar posibles filtraciones. Purgar el balón de vidrio para asegurar la eliminación de la humedad alternando el uso de vacío y argón. Al finalizar, cerrar la válvula de vacío y dejar la válvula de argón abierta durante todo el proceso de síntesis para que suceda en atmósfera inerte.

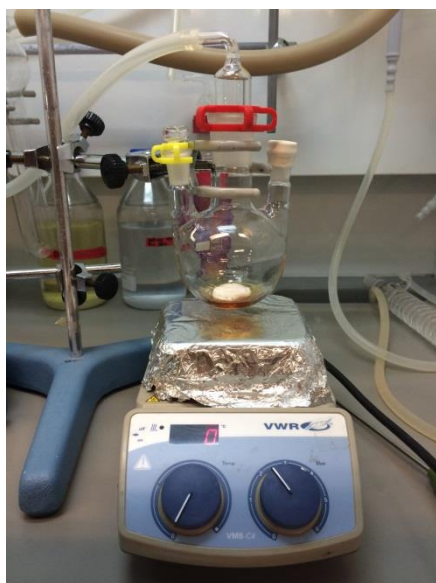


Figura 9. Montaje para la síntesis de G8.



Figura 10. Montaje para la síntesis de G8 con baño de hielo y bomba de infusión.

3. Introducir en el balón de vidrio el volumen necesario de las soluciones que contienen los precursores de Ca y Ti con la ayuda de jeringuillas, una diferente para cada precursor. Conectar el agitador magnético, que deberá permanecer encendido durante todo el proceso de síntesis, y dejar que se mezclen las soluciones durante 1 hora.
4. Colocar el balón de vidrio sobre un baño de hielo, procurando que la temperatura no descienda de los 12°C durante el resto del proceso (ya que el 1,4-dioxano se congelaría).
5. Preparar el montaje de la figura 10 para introducir, con la ayuda de una jeringuilla y una bomba de infusión, el volumen calculado de la solución que contiene el precursor de P a 2ml/h.
6. Añadir el volumen requerido de 1,4-dioxano destilado con la ayuda de una jeringuilla.
7. Luego con el mismo montaje que en el paso anterior (6) añadir el volumen necesario de catalizador básico a 1ml/h.
8. Una vez introducidos todos los componentes traspasar la solución a tres viales de cristal herméticamente cerrados con agitadores. Hacerles una envoltura de papel de aluminio (para que se transmita el calor homogéneamente) y otra de papel.
9. Etapa de envejecimiento (figura 11): Dejar durante 2, 4 o 6 días (en función de cada muestra) a una temperatura constante de 70°C y con agitación constante.

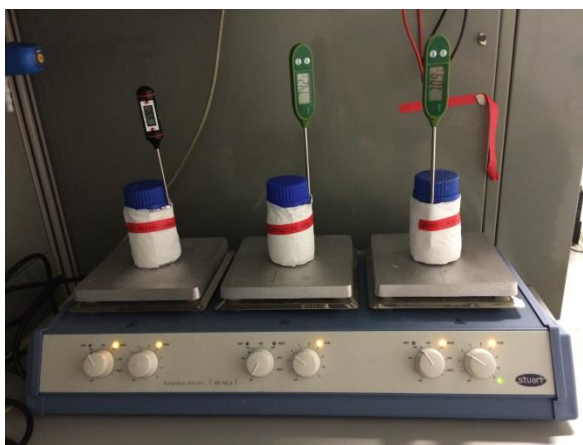


Figura 11. Etapa de envejecimiento.

10. Transcurridos los días de la etapa de envejecimiento, traspasar la solución a tubos de centrífuga. Centrifugar los tubos (figura 12) para poder separar el 1,4-dioxano de las nanopartículas para lavarlas después con etanol absoluto. La centrifugación se lleva a cabo durante 10 minutos a 4°C y 3000 rpm.

11. Tras la primera centrifugación, verter el 1,4-dioxano en un bote de residuos e iniciar los lavados. Añadir aproximadamente 15 ml de EtOH absoluto a los tubos y agitarlos fuertemente con la ayuda de un vortex para que las nanopartículas se dispersen y el etano disuelva restos de 1,4-dioxano. Volver a centrifugar en las mismas condiciones (10) y verter el etanol en un bote de residuos.

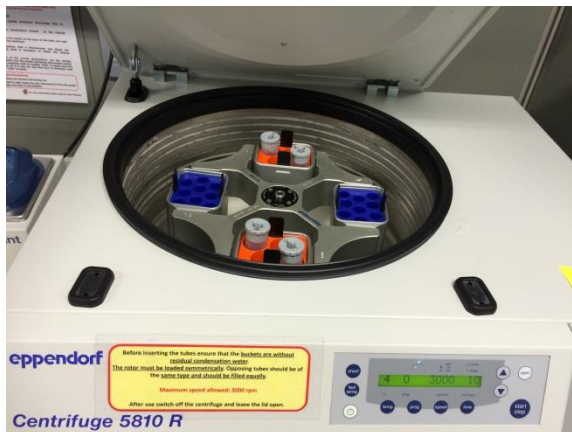


Figura 12. Centrifugadora para separar el solvente de las nanopartículas.

12. Repetir el paso anterior (11) cinco veces para que al verter el etanol se lleve restos de 1,4-dioxano e impurezas disueltos en él.
13. Tras verter el etanol de la última repetición, meter en la estufa los tubos de centrifuga abiertos y dejarlos durante 24 horas a 70°C para evaporar los restos de etanol absoluto.
14. Una vez estén secas las nanopartículas, pulverizar con la ayuda de un mortero (figura 13).

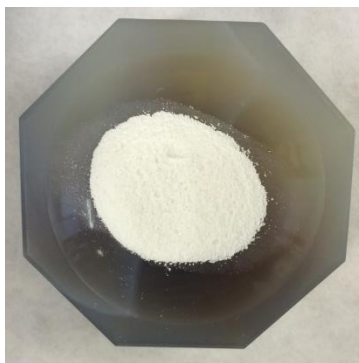


Figura 13. Nanopartículas de G8 pulverizadas (aspecto final).

15. Introducir en un vial pequeño de vidrio y volver a meterlas abiertas en la estufa durante 24 horas a 90°C para evaporar el acetonitrilo, ya que es citotóxico. Pasado ese tiempo conservar las nanopartículas obtenidas a temperatura ambiente.
16. Finalizado todo el proceso se puede dar paso a la caracterización.

Todo el material utilizando durante este proceso de síntesis tiene que lavarse minuciosamente con agua y jabón, agua *miliQ*, etanol absoluto y acetona.

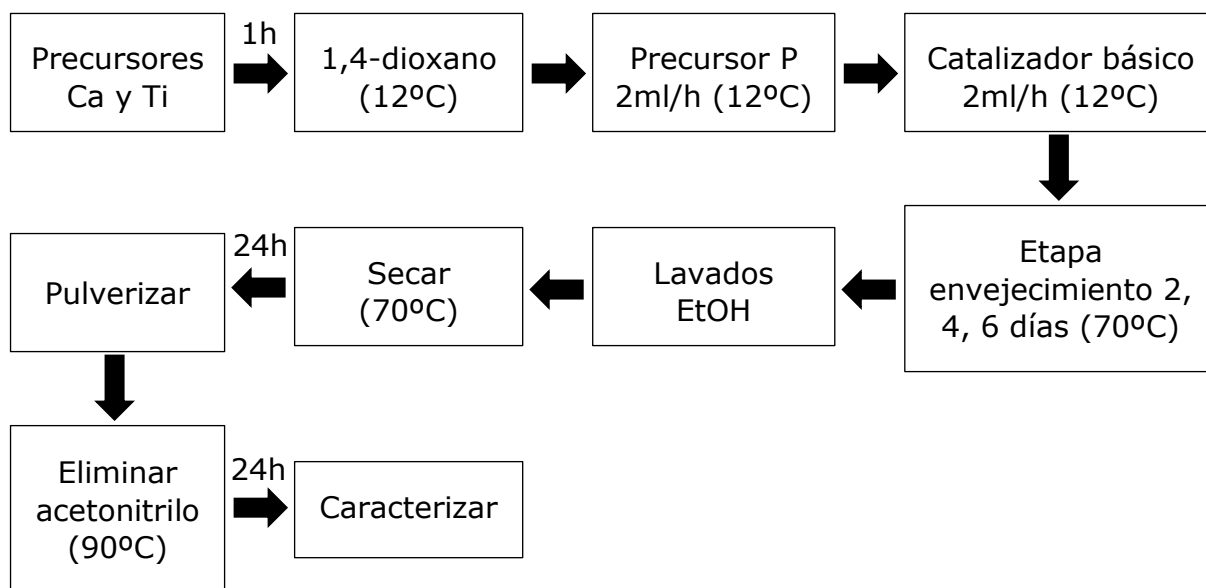


Figura 14. Diagrama de flujo de la síntesis de G8(2.D), G8(4.D) y G8(6.D).

Estas tres muestras se prepararon conjuntamente en el mismo balón de vidrio. Se separaron en tres viales en el momento de iniciar el envejecimiento. De esta manera se consigue que las tres muestras difieran entre sí lo menor posible. Así, en el momento de caracterizarlas para analizar las posibles diferencias entre ellas sea más probable que dichas diferencias sean consecuencia de una sola variable: el tiempo de duración de la etapa de envejecimiento.

Para las muestras de G8 en las que la variable a modificar es el dispersante solo hubo que tener en cuenta ciertos cambios en el protocolo anteriormente descrito (figura 14):

- G8(4.A): La temperatura del baño de hielo con la que se trabajó fue de 2-3°C aproximadamente y se tuvo que controlar que la de la etapa de envejecimiento no aumentara de 55°C, ya que los puntos de fusión y ebullición de la acetona son, respectivamente, -94°C y 56°C. En consecuencia, durante la síntesis de esta muestra quedó claro que los resultados no serían positivos, ya que a una temperatura de envejecimiento durante 4 días a una relativa baja temperatura no se obtendrían unas nanopartículas adecuadas.
- G8(4.C): La temperatura del baño de hielo se controló para que no descendiera de los 7°C (punto de fusión del ciclohexano) y los lavados de las nanopartículas se realizaron con acetona, ya que este dispersante no es miscible en etanol.
- G8(4.T): La temperatura del baño de hielo con la que se trabajó fue de 2-3°C aproximadamente, ya que el punto de fusión del tolueno es de -95°C y los lavados de las nanopartículas se realizaron con acetona, ya que este dispersante tampoco es miscible en etanol.

- G8(4.Ac): Para asegurar la dispersión de todas las soluciones que contienen los precursores en el aceite, los precursores del Ca y el Ti se añadieron al aceite con la ayuda de una bomba de infusión a 5 ml/h mezclados previamente entre ellos durante 1 hora como se describe en el punto (3) del protocolo. La temperatura del baño de hielo fue controlada para que no disminuyera de los 10°C, para evitar la gelificación del aceite. Finalmente se realizaron los lavados con acetona, ya que este el aceite no es soluble en etanol.

En las muestras de G8 en las que la variable a modificar es la adición de un surfactante solo tuvo que añadirse un paso en el protocolo. En las muestras de G8(4.D.TX) y de G8(4.D.TW) se añadió el triton® X-100 y el tween® 20, respectivamente, a la solución con la ayuda de una jeringuilla antes de introducir el catalizador básico. En el caso de la muestra de G8(4.D.PVA) la solución acuosa de PVA se añadió después del catalizador básico.

La temperatura del baño de hielo se bajó todo lo posible (en función de la temperatura de fusión del dispersante utilizado) para evitar precipitaciones de brushita y otros fosfatos de calcio que se forman al añadir la solución de P_2O_5 que se ven favorecidas a cuanto más temperatura ocurra el proceso de adición.

3.2. Métodos de caracterización

Para poder analizar las muestras de partículas de G8 sintetizadas y determinar mejoras en algún aspecto, gracias a las variaciones aplicadas durante su fabricación, es necesario caracterizarlas. Para ello existen distintas técnicas y equipos. En este proyecto se han empleado los que se describen brevemente a continuación. Con ellos se ha querido conocer la composición, morfología, tamaño, presencia de estructuras cristalinas, carga superficial, temperatura de transición vítrea, presencia de materia orgánica y ratio de liberación de calcio de las nanopartículas.

3.2.1. *Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy (EDS)*

La composición química de las muestras se ha obtenido gracias al sistema EDS (Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy) integrado en un SEM (Scanning Electron Microscopy).



Figura 15. Equipo SEM-EDS.



Figura 16. Porta muestras (peana) para análisis SEM-EDS y FE-SEM.

La muestra que se introduce en el equipo (figura 15) es sometida a un haz de electrones y los átomos que la componen generan ciertas emisiones como los rayos X. Dado que cada elemento químico emite fotones con energías diferentes y características, los rayos X son separados en un espectro de energía para luego ser comparados con los de una base de datos y obtener la composición química de la muestra. [32, 41]

Para la preparación de las muestras se utilizó una peana (figura 16) que se dividió en cuatro para colocar cuatro pequeñas cantidades de muestras diferentes y, así, reducir costes. Luego estos portamuestras fueron llevados a grafitar (poner una fina capa de grafito sobre el soporte) para permitir la conducción de electrones.

3.2.2. *Field Emission-Scanning Electron Microscopy (FE-SEM)*

Con el equipo FE-SEM (Field Emission-Scanning Electron Microscopy) se han podido obtener imágenes de las muestras de partículas de G8 con las que analizar su morfología. Este SEM integra como fuente de electrones un cañón de emisión de campo que permite la emisión de electrones de alta energía más focalizados con lo que la resolución espacial se mejora. Los haces de electrones emitidos sobre la muestra interactúan con su superficie la cual emite en consecuencia otros electrones. Se analiza el ángulo y la velocidad de emisión de estos electrones de respuesta obteniendo como resultado una señal electrónica que luego nos proporciona una imagen digital. [34, 35]

Se aprovecharon las muestras ya grafitadas en las peanas que se habían utilizado para el análisis de la composición química con el equipo SEM-EDS.

3.2.3. *Dynamic Light Scattering (DLS)*

La técnica DLS (Dynamic Light Scattering) permite determinar el rango de distribución del tamaño de pequeñas partículas que se encuentran en suspensión en una solución. Se trata de emitir un haz de luz láser que se dispersa en múltiples direcciones al llegar a las partículas en suspensión. Cuando estos haces de luz se dispersan e interfieren entre ellos se adquiere una intensidad de dispersión determinada. También se tiene en cuenta que los movimientos relativos de las propias partículas varían las intensidades de dispersión, ya que cuanto más pequeñas sean estas partículas más rápidas serán las variaciones que provoquen. Esta técnica utiliza dicha variación de la intensidad de dispersión en el tiempo para determinar el tamaño de las partículas. [36, 37]



Figura 17. Célula de cuarzo para análisis DLS.

Para analizar el tamaño de partícula de las muestras se prepararon en *ependorfs* soluciones de EtOH absoluto con muy poca cantidad de muestra (menos de una punta de espátula) y se dispersaron con la ayuda de un ultrasonidos portátil. Luego, con la ayuda de una pipeta *pasteur*, se introdujo la solución dentro de la célula de cuarzo (figura 17) que es atravesada por los haces de luz.

3.2.4. X-ray Diffraction (XRD)

Para saber si las muestras de G8 sintetizadas tienen impurezas con estructuras cristalinas se les aplicó la técnica de difracción por rayos X. Esta característica es muy importante en el biovidrio que se ha sintetizado, ya que su degradabilidad depende mucho de la cristalinidad y lo que interesa es conseguir nanopartículas con estructura amorfa. Al emitirse un haz de rayos X de una longitud de onda determinada sobre una muestra, cada sólido cristalino que pueda haber en esa sustancia dispersará el haz de luz en un ángulo determinado. Este fenómeno se describe mediante la ley de Bragg (8), la cual predice el ángulo característico en que cada sólido cristalino difracta el haz de rayos X. [39, 40]

$$n \cdot \lambda = 2 \cdot d \cdot \sin \theta \quad (7)$$

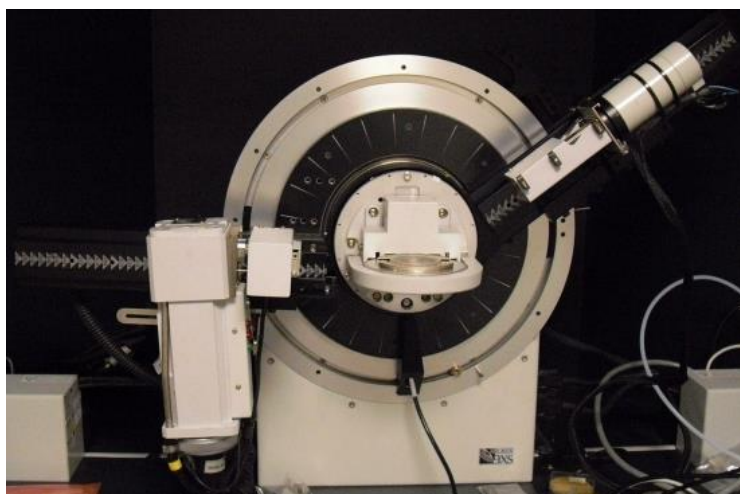


Figura 18. Equipo de X-ray Diffraction. [34]



Figura 18. Portamuestras para X-Ray Diffraction.

Como cada sólido cristalino tiene un difractograma que lo caracteriza, es posible identificar las fases cristalinas que aparezcan en los resultados y de ese modo saber que impurezas de tipo cristalino se han formado durante la etapa de envejecimiento de las muestras sintetizadas. Para ello se tiene que realizar una búsqueda exhaustiva (en una base de datos que contiene algunos ángulos de difracción identificados de ciertas fases cristalinas) de los posibles compuestos cristalinos que se hayan podido formar y comparar sus ángulos de difracción (2θ) con los de los difractogramas obtenidos tras las pruebas.

Para la preparación de las muestras se puso suficiente cantidad de polvo de cada en los portamuestras (figura 18) y se prensó para evitar que quedasen huecos vacíos entre las partículas.

3.2.5. Zeta Potential

El potencial Z determina la carga superficial de las partículas, es decir, la diferencia de potencial que existe entre la capa estacionaria de dispersante unido a la partícula y el medio dispersante. El valor del potencial Z no puede determinarse directamente, por lo que se calcula a partir de la movilidad electroforética. Es decir, a partir del movimiento de una partícula cargada en relación al líquido en el que se encuentra dispersa al aplicársele un campo eléctrico. Para ello se aplica un campo eléctrico a la célula de conductividad (figura 19), donde se ha introducido la muestra en dispersión, y las partículas son atraídas por el electrodo de carga opuesta. Entonces se emite un haz de luz láser que alcanza las partículas en movimiento induciendo un cambio de frecuencia por efecto Doppler. La diferencia resultante es proporcional a la movilidad electroforética y, en consecuencia, proporcional al valor de potencial zeta. [42]

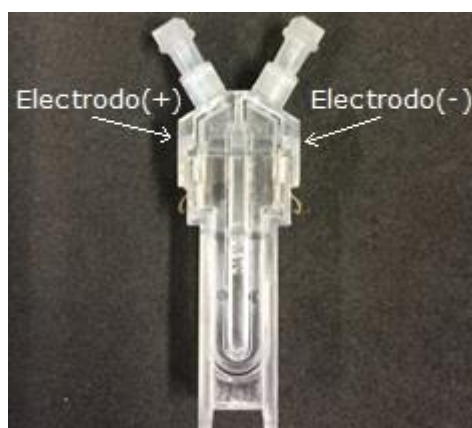


Figura 19. Célula de conductividad para análisis de Potencial Z.

Gracias al valor de potencial zeta se consigue saber el nivel de atracción o repulsión entre las diferentes partículas lo cual hace posible predecir su estabilidad eléctrica. En partículas muy pequeñas (nivel nanométrico) un valor de potencial Z alto ($>\pm 30\text{mV}$), proporciona dicha estabilidad lo cual quiere decir que serán menos propensas a aglomerarse. Por el contrario, si el valor de potencial Z es bajo ($<\pm 30\text{mV}$), las partículas tenderán a aglomerarse. [16]

Para analizar la carga superficial de las muestras se prepararon en *ependorfs* soluciones de EtOH absoluto con suficiente cantidad de muestra y se dispersaron con la ayuda de un ultrasonidos portátil. Luego, con la ayuda de una pipeta *pasteur*, se introdujo la solución dentro de la célula de conductividad.

3.2.6. Differential Scanning Calorimetry (DSC)

El método termoanalítico DSC (Differential Scanning Calorimetry) da como resultado valores de diferencia de calor entre la muestra a medir y una referencia en función de la temperatura. Durante el proceso de medición se aumenta la temperatura linealmente en función del tiempo de manera que cuando la muestra sufre una transformación física, un cambio de fase por ejemplo, es necesario que fluya más a menos calor a la muestra (dependiendo de si se trata de un proceso exotérmico o endotérmico) que a la referencia para que las dos sigan estando a la misma temperatura. Midiendo esta diferencia de

flujo de calor entre la muestra y la referencia es posible determinar la cantidad de calor absorbido o cedido durante dichas transiciones por parte de la muestra.

Por lo tanto, gracias a esta técnica se puede realizar una caracterización morfológica del material determinando procesos como la fusión, la cristalización o la temperatura de transición vítrea (T_g). Este último parámetro es interesante para los biovidrios sintetizados en este proyecto, ya que es una propiedad de los sólidos amorfos. A esa temperatura sufren un cambio en su capacidad calorífica sin que se produzca un verdadero cambio de fase. [41, 43]



Figura 20. Equipo de DSC.

Para analizar las muestras primero se realizó una calibración del equipo (figura 20) y se analizó la capacidad calorífica de la referencia (un portamuestras vacío). Luego se definió el perfil de temperaturas que seguiría el DSC: primer calentamiento de temperatura ambiente a 590°C a 10°C/min, enfriamiento hasta temperatura ambiente a $\approx 10^\circ\text{C/min}$, segundo calentamiento de temperatura ambiente a 590°C a 10°C/min y enfriamiento hasta temperatura ambiente a $\approx 10^\circ\text{C/min}$. En la primera rampa de calentamiento se calcina la materia orgánica presente en las muestras y con la segunda se ven realmente las propiedades del material. Los portamuestras utilizados fueron de aluminio, en los que se colocó una cantidad aproximada de 5 mg de muestra.

3.2.7. Calcium release

Esta prueba es la más importante para las nanopartículas sintetizadas en este proyecto, ya que el objetivo final de ello es poder crear un material compuesto con ellas y otro material (como por ejemplo PLA o micropartículas) para que liberen Ca^{2+} en el tejido óseo dañado induciendo su regeneración. Por eso es importante determinar la velocidad de liberación de calcio de las nanopartículas en un medio libre de calcio a diferentes intervalos de tiempo.

El método empleado para determinar este parámetro fue el *O-Cresolphthalein Complexone Method*. El calcio forma un complejo de color púrpura con *ortho-cresolphthalein complexone* en un medio alcalino. La inclusión del HCl ayuda al calcio liberado unido a proteínas y al *8hydroxy-quinoline* a eliminar la interferencia por magnesio. 2-amino, 2-methyl y 1-propanol (AMP) proporcionan el medio alcalino adecuado para el color de la reacción. La intensidad del color se mide a 570nm con filtro amarillo/verde [45]. Todos los cálculos referidos a este procedimiento se especifican en el anexo I.

Para preparar el medio sin calcio se mezclaron los volúmenes necesarios de DMEM sin Ca^{2+} , de *Fetal Bovine Serum* (FBS), de glutamina y de penicilina/estreptomicina en un tubo de plástico. Se selló y se guardó en la nevera.

La preparación del *AMB buffer* con un pH de 10,7 se añadió el volumen necesario de *AMP reagent* y de agua *miliQ* mientras se mezclaban con el agitador. Luego se alcanzó el pH deseado con la ayuda de un pH-meter añadiendo gota a gota una solución previamente preparada de HCl. Luego se enrasó el matraz aforado con agua *miliQ* hasta el volumen requerido. Se conservó en la nevera envuelto en papel de aluminio (ya que es fotosensible). Este reactivo es estable durante 3 semanas.

Para la preparación del *colour reagent* se mezclaron un volumen de agua *miliQ* con HCl al 37% y la cantidad calculada de *O-cresolphthalein complexone* previamente disuelta en un poco de agua *miliQ*. Luego se añadió la cantidad requerida de *8hydroxy-quinoline* y se enrasó el matraz aforado hasta el volumen necesario con agua *miliQ*. Se envolvió en papel de aluminio, ya que también es fotosensible, y se conservó a temperatura ambiente. Este reactivo es estable durante un mes.

Para calcular la recta de calibración se prepararon soluciones de medio con concentraciones conocidas a base del medio sin Ca^{2+} previamente elaborado y $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$.

Los intervalos de tiempo en los que se midió el ratio de liberación de calcio fueron 1 hora, 24 horas y 48 horas. Para ello primero se añadió la misma cantidad de nanopartículas en cada *ependorf* (3 mg) y se prepararon 3 repeticiones para cada muestra a analizar. Luego se introdujo con la ayuda de una micropipeta el mismo volumen de medio sin Ca^{2+} en cada *ependorf* y se dejaron durante 1 hora en la incubadora a 37°C. También se utilizaron 3 *ependorfs* en los que solo se puso medio sin Ca^{2+} para restar la lectura de absorbancia de ese medio sin nanopartículas y restarlo en todos los resultados para evitar medidas erróneas. Transcurrido el tiempo se centrifugaron los *ependorfs* a 3000 rpm durante 10 minutos, se extrajeron los volúmenes de medio con el Ca^{2+} liberado en 1 hora con la ayuda de una micropipeta y se traspasaron a nuevos *ependorfs* que se conservaron en la nevera. Luego se añadió de nuevo medio sin Ca^{2+} a los *ependorfs* de las nanopartículas y se dejaron en la incubadora en las mismas condiciones durante 24 horas. Se repitió el mismo proceso para la extracción del medio con Ca^{2+} liberado en 24 horas y se volvió a repetir todo el proceso para 24 horas más.

Con ello se obtuvieron, de cada muestra de G8 distinta, medios con los que conocer la liberación de Ca^{2+} de las nanopartículas al final de su primera hora de inclusión en un medio sin calcio, después de 24 horas más y al cumplir 48 horas desde su primer momento de inclusión en el medio.

Para medir el ratio de liberación de Ca^{2+} se utilizaron placas Multidish de 96 pocillos estériles (figura 21) en las que se añadió en cada uno de los pocillos (con ayuda de micropipetas) 97,56µl de *colour reagent*, luego 4,87µl de los medios con el calcio liberado y finalmente 97,56µl de *AMB buffer*. Se protegieron de la luz con papel de aluminio y se dejaron incubando a temperatura ambiente durante 15 minutos. De cada *ependorf* con medio de calcio liberado se hicieron tres medidas, es decir, se utilizaron tres pocillos por cada uno de ellos. Con lo

que finalmente se obtuvieron 9 valores para la misma muestra de nanopartículas.

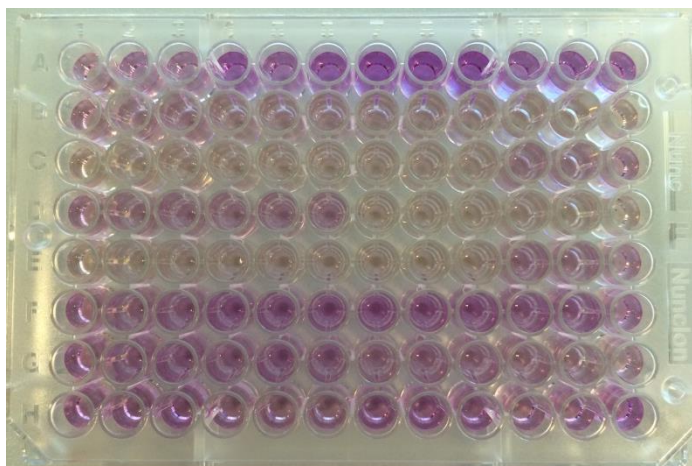


Figura 21. Placa Multidish de 96 pocillos con los medios con Ca^{2+} liberado y los reactivos.

Finalmente se midió la absorbancia con el espectrofotómetro a 570nm con filtro amarillo/verde. Dado que los valores que se obtienen con este equipo por si solos no tienen ningún sentido es necesario calcular una recta de calibración, es decir, con los valores del espectrofotómetro para los pocillos en que se pusieron las soluciones de medio con distintas concentraciones de Ca^{2+} conocidas y las respectivas concentraciones se pudo determinar una función lineal con la que luego calcular la concentración de calcio en los distintos medios para cada muestra y luego los correspondientes ratios de liberación de Ca^{2+} .

3.2.8. *pH-meter*

El *pH-meter* permite determinar el pH de una solución, es decir, cuantificar su medida de acidez o basicidad indicando la concentración de H_3O^+ (iones hidronio).

Se trata de una técnica electroquímica que mide el potencial generado a través de una membrana de vidrio que separa dos soluciones con concentraciones de protones diferentes: la solución de la cual se quiere obtener el pH y la solución de HCl 0,1M saturado que hay en el interior de la célula de medida. Dicha célula es de un vidrio no conductor, el cual contiene en su extremo un electrodo de un vidrio polarizable que es sensible a las variaciones de pH. Al mantener constante el voltaje en el interior de dicho electrodo la medida será el resultado de la diferencia de potencial que dependerá únicamente del pH de la solución en la que se sumerja la célula de medida. [42, 46]

Para medir el pH de los medios en los que se había liberado Ca^{2+} (3.2.8) primero se calibró el *pH-meter* utilizando tres soluciones *buffer* con pH conocidos. Luego se indicó la temperatura, ya que la medida de pH es sensible a ella. Seguidamente se fue sumergiendo la célula de medida en los medios de Ca^{2+} liberado determinando su pH.

CAPÍTULO 4:

RESULTADOS Y

DISCUSIÓN

En este capítulo se muestran los resultados obtenidos de la caracterización de las muestras.

4.1. Composición química

La composición química de las distintas muestras de G8 sintetizadas se intentó aproximar lo máximo posible al porcentaje molar inicialmente buscado: 56% CaO – 36% P₂O₅ – 8% TiO₂. Para ello se realizó un experimento de la muestra G8(4.D) utilizando como volúmenes de los precursores los valores teóricos calculados, y con los resultados del análisis EDS se recalcularon los volúmenes para reajustar la composición. Esto fue necesario hacerlo porque en procesos experimentales como éste existe una alta dispersión que es difícil de controlar como, por ejemplo, el valor real de concentración de las soluciones de los precursores o los volúmenes exactos que se introducen en la preparación (por pérdidas en las jeringuillas o medidas imprecisas). Durante el proceso de fabricación de todas las muestras se intentaron mantener las mismas condiciones de operación. Finalmente, mediante la técnica EDS, las composiciones químicas obtenidas de las muestras fueron (tabla 3):

Tabla 3. Composición química media (% molar) de las muestras obtenido por EDS.

| | % CaO | Std. desv | % P ₂ O ₅ | Std. desv | % TiO ₂ | Std. desv. |
|---------|-------|-----------|---------------------------------|-----------|--------------------|------------|
| G8(2.D) | 60,08 | 0,32 | 37,17 | 0,38 | 2,74 | 0,17 |
| G8(4.D) | 60,30 | 0,39 | 37,04 | 0,16 | 2,65 | 0,27 |

| | | | | | | |
|-------------|-------|------|-------|------|-------|------|
| G8(6.D) | 60,92 | 0,34 | 36,58 | 0,38 | 2,50 | 0,07 |
| G8(4.C) | 61,91 | 0,73 | 32,11 | 0,32 | 5,97 | 0,67 |
| G8(4.A) | 55,90 | 0,43 | 30,76 | 0,63 | 13,34 | 0,21 |
| G8(4.T) | 54,06 | 0,28 | 35,08 | 1,11 | 10,85 | 1,38 |
| G8(4.Ac) | 56,08 | 1,25 | 32,77 | 1,15 | 11,16 | 0,49 |
| G8(4.D.TX) | 60,41 | 0,40 | 36,39 | 0,10 | 3,20 | 0,44 |
| G8(4.D.TW) | 52,69 | 2,08 | 38,03 | 0,83 | 9,28 | 2,71 |
| G8(4.D.PVA) | 53,92 | 0,29 | 33,33 | 0,56 | 12,75 | 0,28 |

Prácticamente todos los valores de las desviaciones estándar de las medidas tomadas de cada muestra son bajos, lo cual indica que de forma general los vidrios sintetizados son bastante homogéneos. Se puede observar que el porcentaje molar de CaO y P_2O_5 se aproxima a los valores deseados. En cambio, no se ha podido alcanzar una composición de vidrio G8 propiamente dicha, ya que en todas las muestras obtenidas hay un incremento o disminución notable en el porcentaje molar de TiO_2 . Debido al tiempo limitado para realizar más iteraciones no se pudieron sintetizar más muestras para intentar reajustar más la composición química a los valores buscados.

En la figura 22 se pueden observar visualmente las composiciones químicas de las tres muestras en las que el parámetro a variar fue el tiempo de duración de la etapa de envejecimiento. Se ha representado el valor del TiO_2 , la relación de porcentajes molares de CaO/ P_2O_5 y los valores esperados de ambos.

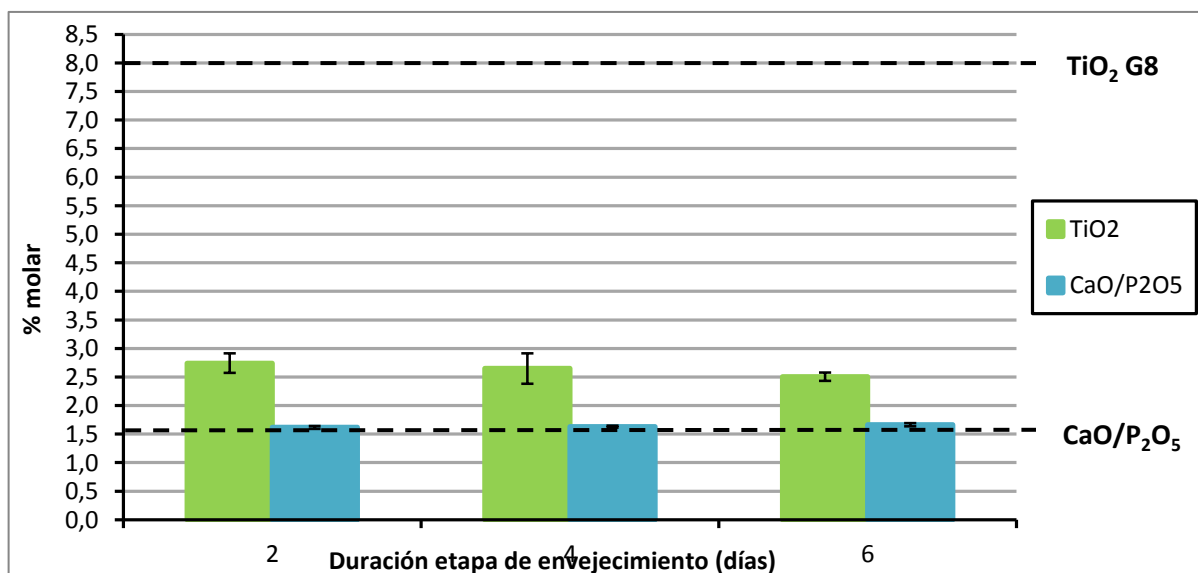


Figura 22. Composición química de las muestras G8(2.D), G8(4.D) Y G8(6.D).

Dejando a un lado que el porcentaje de TiO_2 está claramente por debajo del valor esperado, lo cual debe ser la consecuencia de un error experimental que con el reajuste de los volúmenes de los precursores podría solucionarse, es importante destacar que en lo que se refiere a la composición química el tiempo de duración de la etapa de envejecimiento no afecta.

Para confirmar que el tiempo de envejecimiento no afecta a la composición química habría que volver a sintetizar las 3 muestras de la misma manera pero reajustando los volúmenes de los precursores. Para asegurar que al añadir

mayor volumen de TiO_2 con el que llegar al 8% deseado, este no necesite más tiempo de envejecimiento para incorporarse a la red vítrea.

Para las muestras en que el factor que se varió fue el tipo de sustancia dispersante, se han comparado sus composiciones químicas en función de dos parámetros distintos: la densidad del dispersante y su permitividad relativa. En las figuras 23 y 24 se observan los resultados de dichas comparaciones:

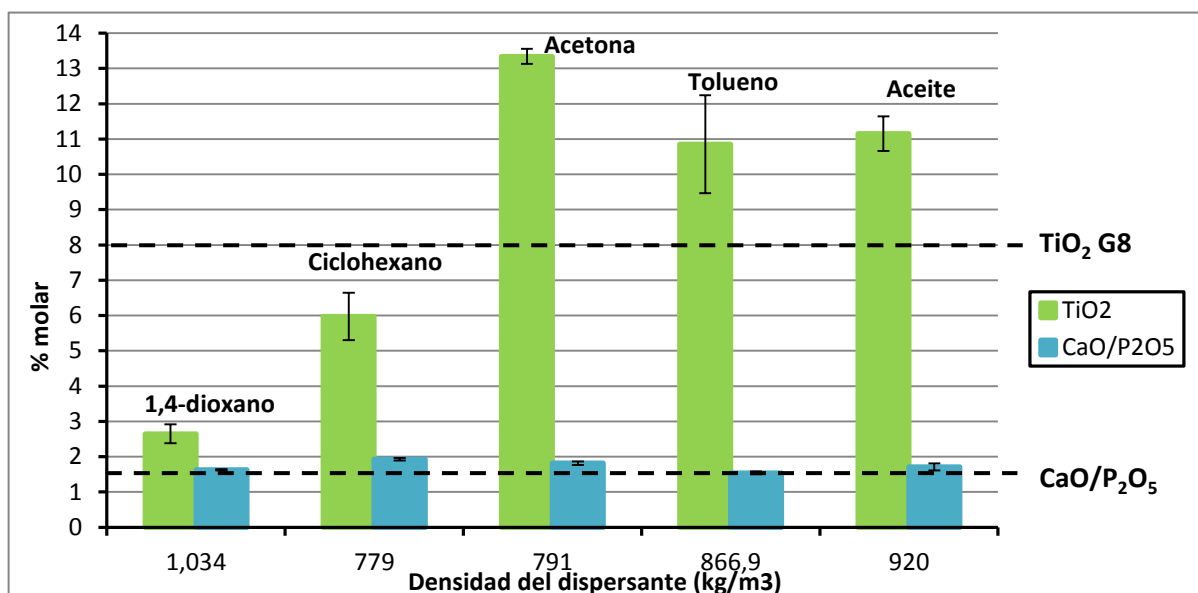


Figura 23. Composición química de las muestras G8(4.D), G8(4.C), G8(4.A), G8(4.T) y G8(4.Ac) en función de la densidad del dispersante.

Aunque la proporción $\text{CaO}/\text{P}_2\text{O}_5$ se sigue ajustando bastante al valor esperado, aunque no tanto en las muestras con ciclohexano y acetona, el porcentaje de TiO_2 varía bruscamente de un vidrio a otro sin una clara relación en función del aumento o disminución de la densidad. Aunque se observa que la mayor diferencia del porcentaje de TiO_2 es entre la muestra con 1,4-dioxano y el resto, al igual que la mayor diferencia de densidad.

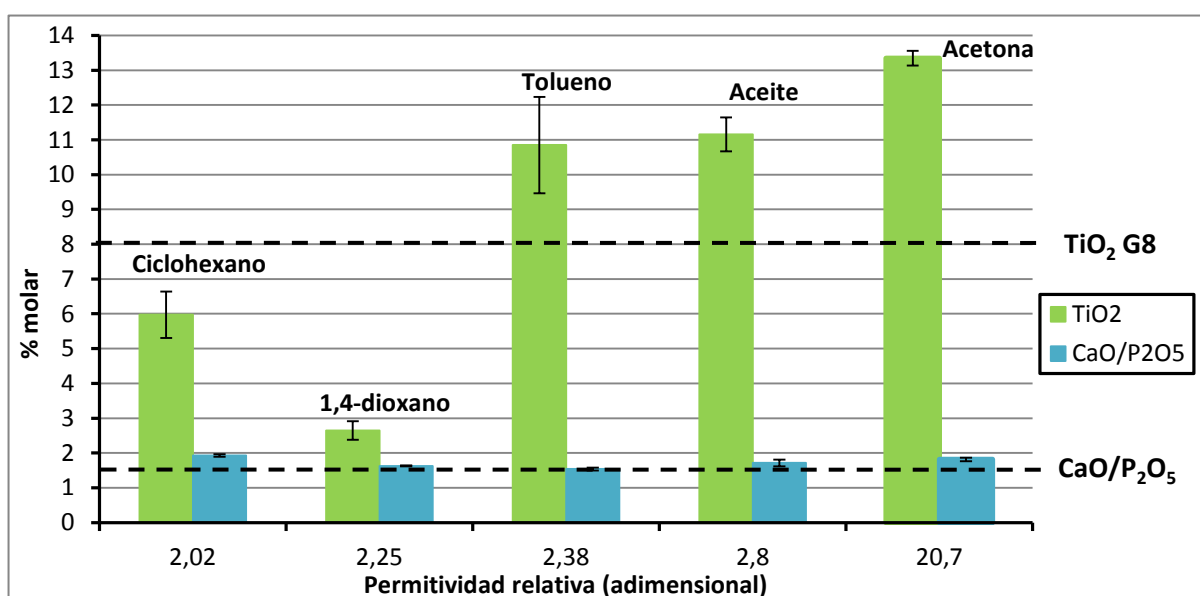


Figura 24. Composición química de las muestras G8(4.D), G8(4.C), G8(4.A), G8(4.T) y G8(4.Ac) en función de la permitividad relativa del dispersante.

Como ocurre con la densidad, el factor de la permitividad relativa del dispersante no nos proporciona una relación clara con el incremento o disminución del TiO_2 .

Por último las muestras en las que se añadió un surfactante se han comparado en función de su CMC (figura 25), es decir, su concentración micelar crítica (apartado 2.6).

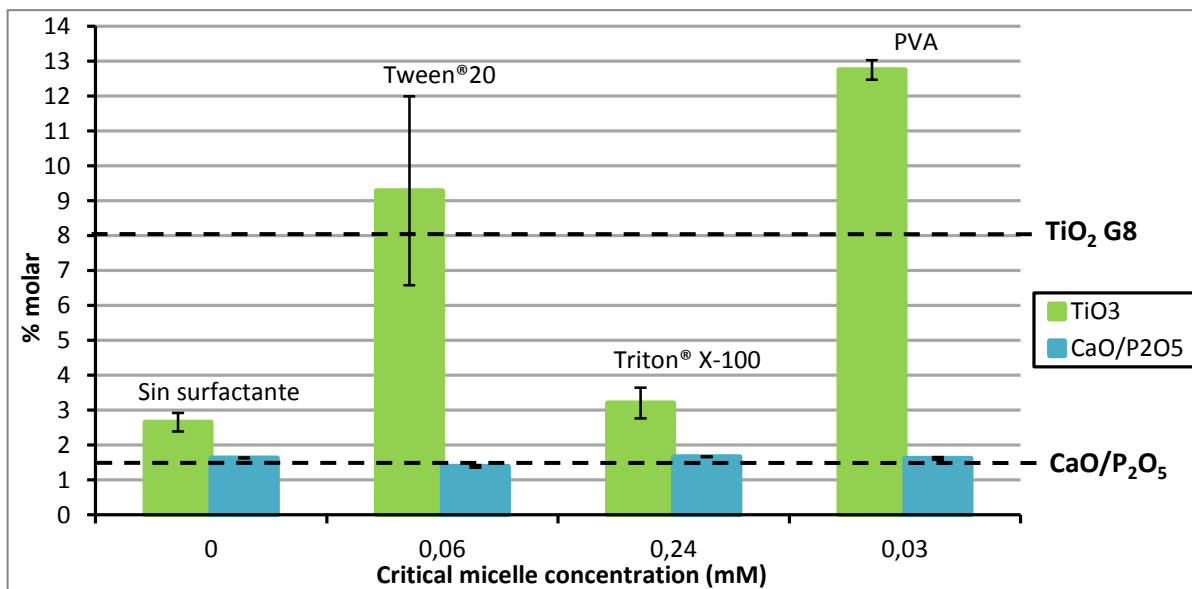


Figura 25. Composición química de las muestras G8(4.D), G8(4.D.TX), G8(4.D.TW) y G8(4.D.PVA) en función del CMC del surfactante.

En las muestras de vidrio en que se añadió surfactantes se sigue viendo una proporción de $\text{CaO}/\text{P}_2\text{O}_5$ prácticamente exacta al valor deseado aunque sigue existiendo una diferencia demasiado amplia entre el porcentaje molar de TiO_2 real y el buscado. Aunque tal y como se observa la muestra G8(4.D.TW) es la que más se ajusta a los valores deseados aunque realmente se trataría de un vidrio G9 y su desviación estándar es demasiado amplia. Tampoco se observan variaciones claras de la proporción de TiO_2 en función del CMC de los surfactantes. Podría pensarse que la adición de surfactantes en la solución dificulta la incorporación del TiO_2 en la red vítrea durante la etapa de envejecimiento pero con los resultados obtenidos esto solo se cumpliría en el caso de la muestra G8(4.D.TX), ya que en las muestras G8(4.D.TW) y G8(4.D.PVA) para un mismo volumen de precursor ha habido una mayor incorporación de TiO_2 en la red.

4.2. Morfología

En cuanto a la morfología se han detectado ciertas diferencias que pueden observarse gracias a las imágenes obtenidas con el FE-SEM. El tamaño de las partículas no puede determinarse claramente con esta técnica, debido a que al reutilizar las muestras del EDS éstas no se dispersaron en etanol y las partículas aparecen demasiado agregadas entre ellas como para distinguirlas individualmente. Entre las muestras sometidas a un mismo cambio de variable no se han detectado cambios significativos, pero sí entre las muestras en las que se cambiaron distintas variables. Las imágenes que siguen a continuación (figuras 26, 27 y 28) son las correspondientes a las muestras en que se cambió la duración de la etapa de envejecimiento:

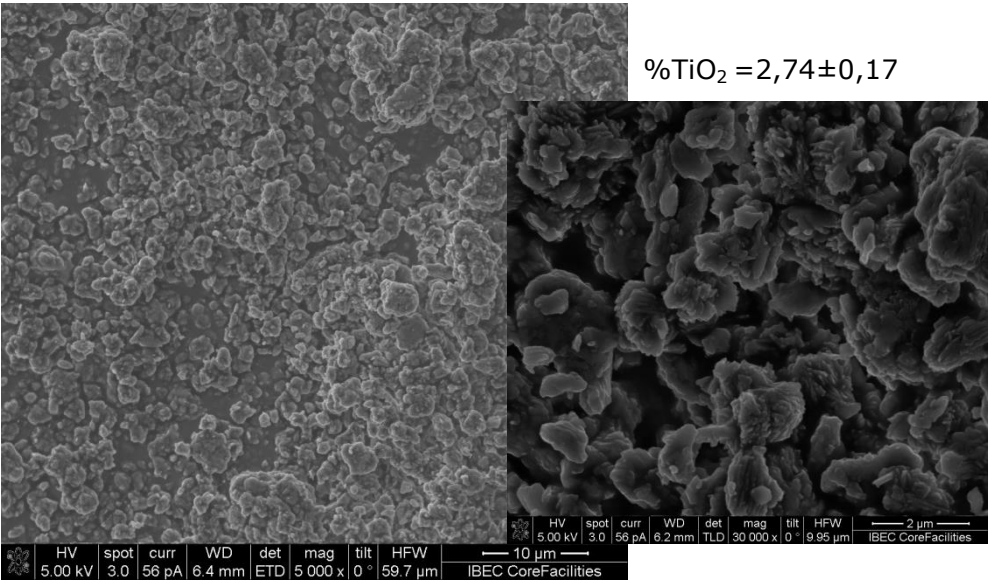


Figura 26. Imágenes FE-SEM de la muestra G8(2.D).

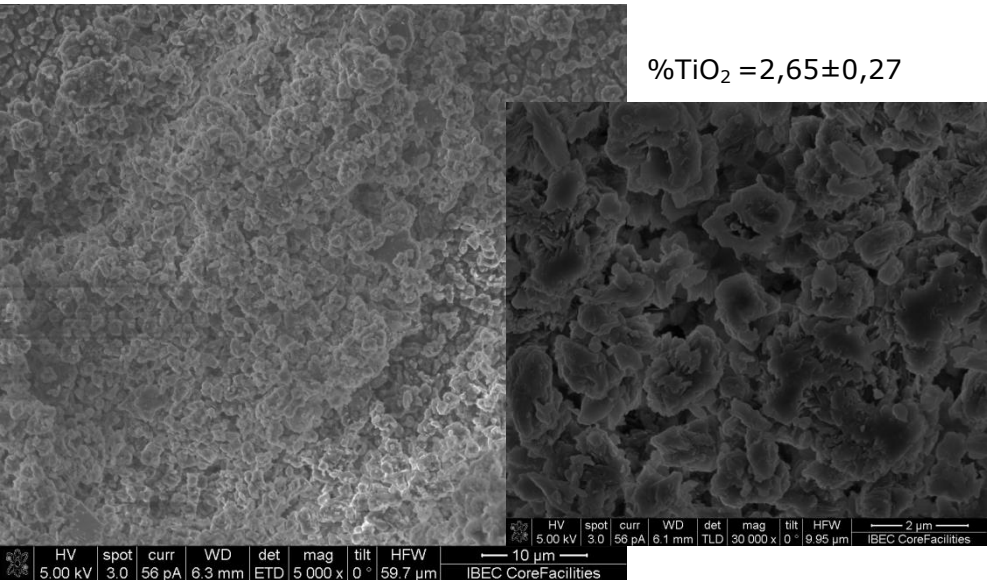


Figura 27. Imágenes FE-SEM de la muestra G8(4.D).

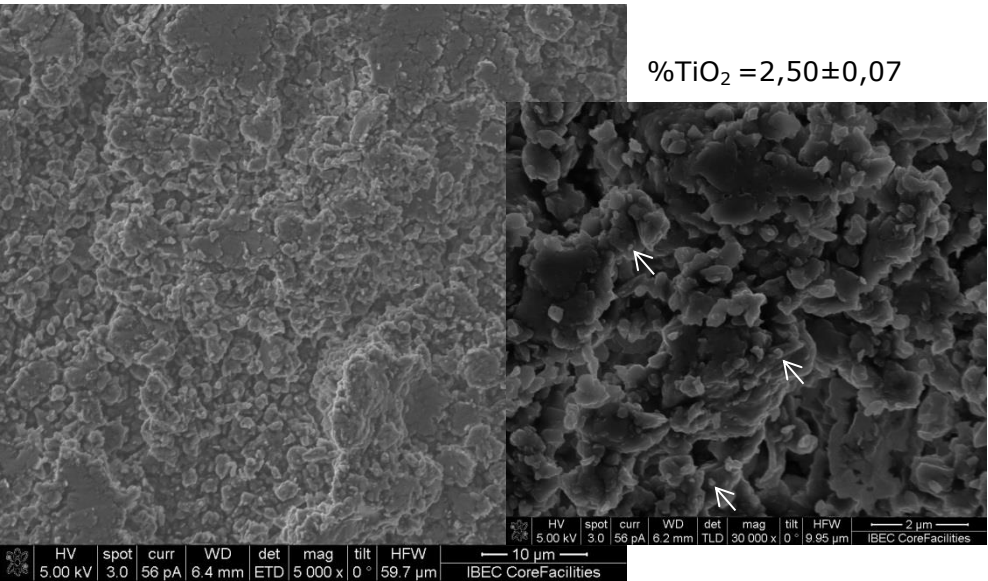


Figura 28. Imágenes FE-SEM de la muestra G8(6.D).

Tal y como puede observarse en las imágenes anteriores, aparentemente las tres muestras tienen una morfología muy similar con el mismo rango de distribución y agregación. Al ampliar las imágenes es cuando se pueden apreciar ciertas diferencias. Las muestras G8(2.D) y G8(4.D) tienen una morfología prácticamente idéntica en las aglomeraciones (que es lo que realmente se puede observar). Por el contrario, en la muestra G8(6.D) se pueden ver ciertas partículas o agregaciones de menos partículas (flechas en la imagen) con formas más redondeadas que podrían ser de tamaño nanométrico. Aunque se siguen presentando grandes aglomeraciones. El bajo porcentaje de TiO_2 en las tres muestras puede ser uno de los factores que provoca la falta de uniformidad de las partículas, ya que el titano es el que les confiere la estabilidad y les otorga la apariencia redondeada.

Para las muestras en que se varió el tipo de sustancia dispersante:

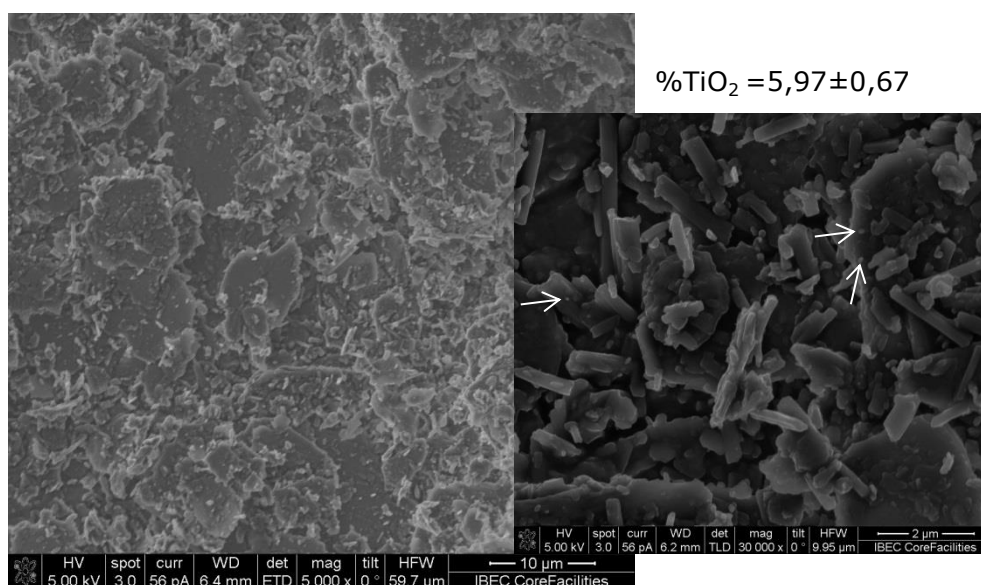


Figura 29. Imágenes FE-SEM de la muestra G8(4.C).

Para la muestra con ciclohexano como dispersante (figura 29) se observan posibles nanopartículas con una morfología redondeada, también grandes aglomeraciones de partículas y ciertas estructuras que podrían ser algún tipo de sólido cristalino que se haya formado durante la etapa de envejecimiento.

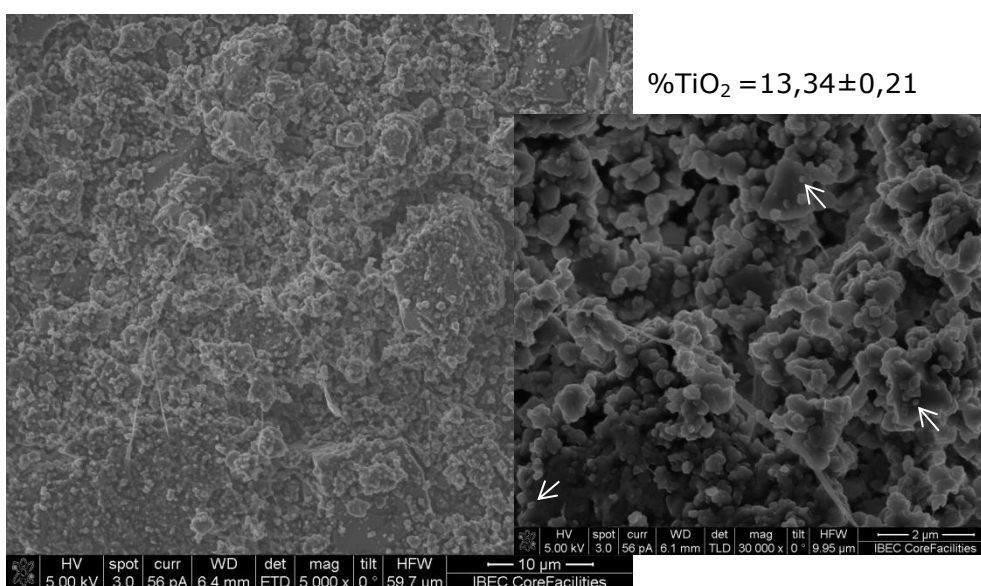


Figura 30. Imágenes FE-SEM de la muestra G8(4.A).

En la muestra en la que se utilizó acetona como dispersante (figura 30) se observa una clara diferencia respecto a las muestras anteriores ya que existen aglomeraciones más pequeñas y es posible ver nanopartículas (o aglomeraciones de unas pocas nanopartículas) con mayor facilidad. Probablemente se deba a que el porcentaje de TiO_2 en este vidrio es mucho mayor que en el resto. También se observan ciertas impurezas.

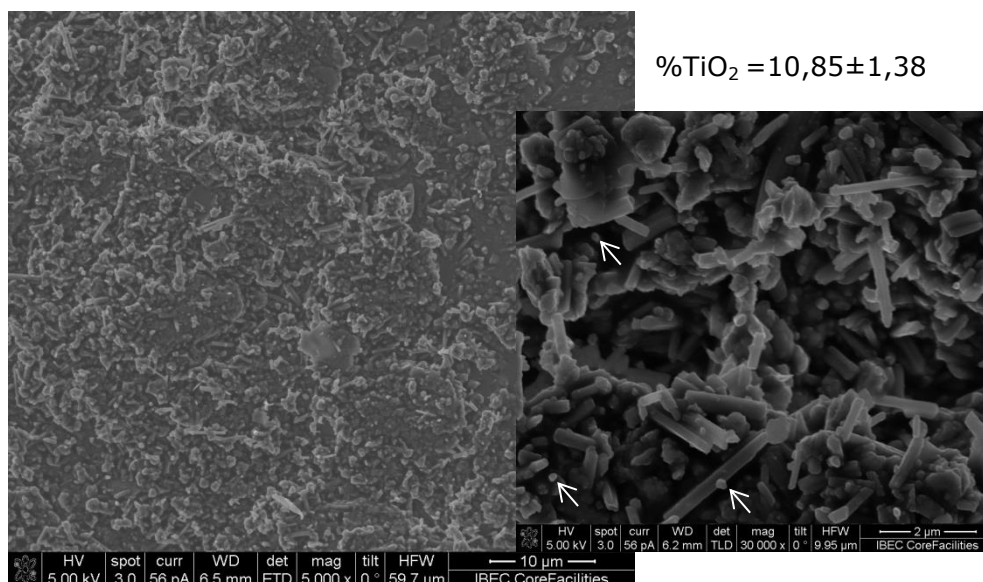


Figura 31. Imágenes FE-SEM de la muestra G8(4.T).

En la imagen de la muestra con tolueno (figura 31) vuelven a observarse estructuras de posibles sólidos cristalinos formados durante la etapa de envejecimiento, pero esta vez en mayor cantidad que en el caso de la muestra G8(4.C). Pueden verse algunas partículas monodispersas de posible tamaño nanométrico y ciertas aglomeraciones.

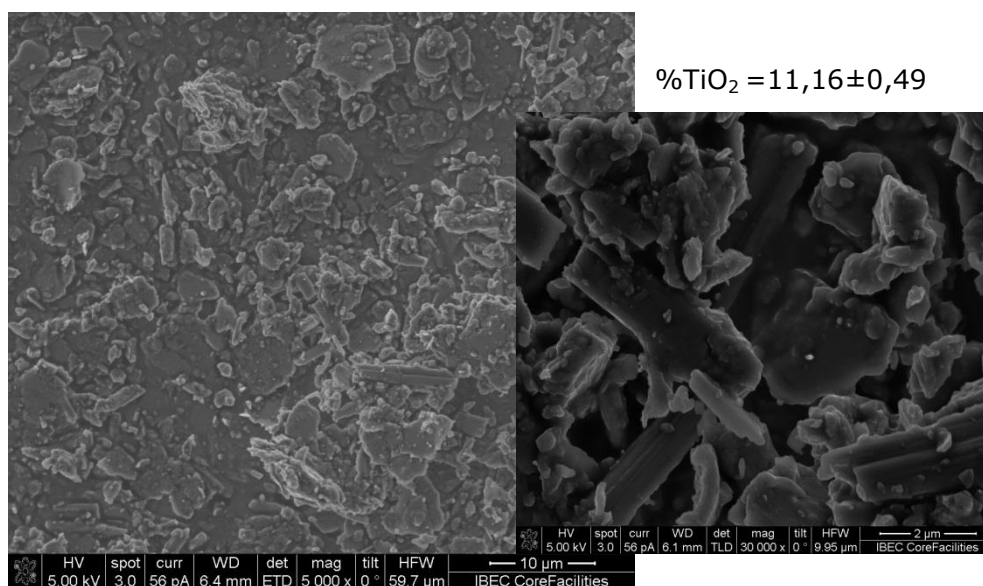


Figura 32. Imágenes FE-SEM de la muestra G8(4.Ac).

En las imágenes de la muestra en la que se empleó aceite como dispersante (figura 32) se observan grandes aglomeraciones de partículas y, sobre todo, grandes estructuras posiblemente cristalinas.

Finalmente estas últimas imágenes se corresponden a las tres muestras en que se añadieron distintos tipos de surfactantes:

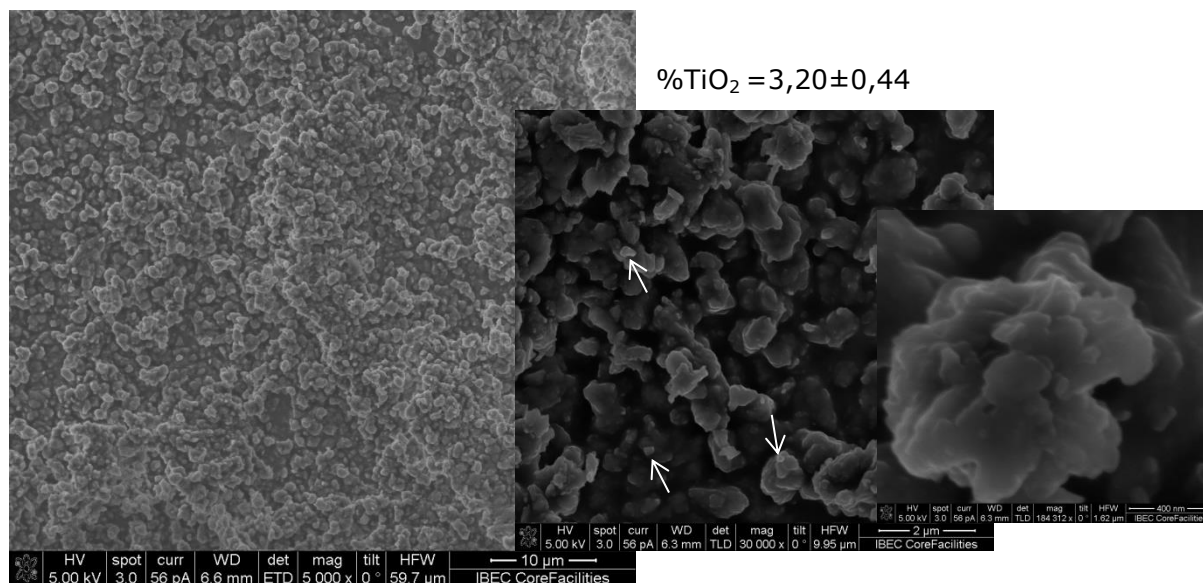


Figura 33. Imágenes FE-SEM de la muestra G8(4.D.TX).

En la muestra en la que se añadió el surfactante Triton® X-100 (figura 33) se observa una distribución muy uniforme de todas las partículas con una morfología bastante estable y redondeada. Siguen existiendo aglomeraciones de partículas pero de menos cantidad. Teniendo en cuenta que el porcentaje de TiO_2 en este vidrio es muy bajo es muy probable que el aumento de monodispersión sea a causa de la adición del Triton® X-100. Por lo tanto, si se consiguiera una composición con un mayor porcentaje de TiO_2 y se fuera modificando el volumen de surfactante a añadir para analizar su verdadero efecto quizá se consiguiera una morfología más próxima a la deseada limitando el tamaño de partícula, estabilizando su forma y monodispersándolas.

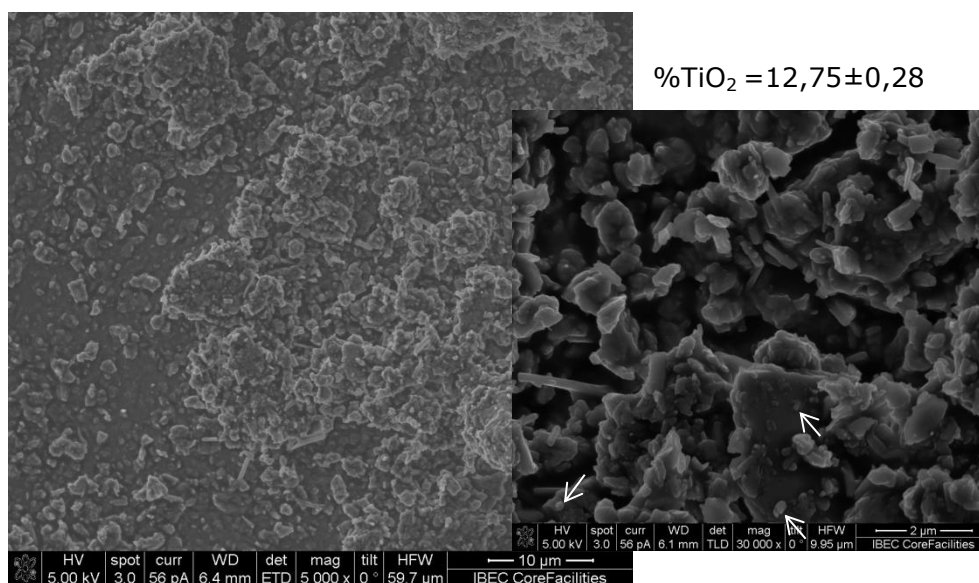


Figura 34. Imágenes FE-SEM de la muestra G8(4.D.PVA).

En las imágenes de la muestra en la que se utilizó PVA (figura 34) puede observarse también una mayor uniformidad i dispersión en la distribución de las partículas en comparación con las muestras en que no se añadieron surfactantes.

Se observan ciertas partículas aparentemente monodispersas y de posible tamaño nanométrico, aglomeraciones de un menor número de partículas agregadas y alguna gran aglomeración. Habría que intentar conseguir un vidrio con un porcentaje de TiO_2 más bajo para asegurar que esta aparente mayor estabilidad de las partículas se debe a la adición del PVA y no del alto contenido en TiO_2 .

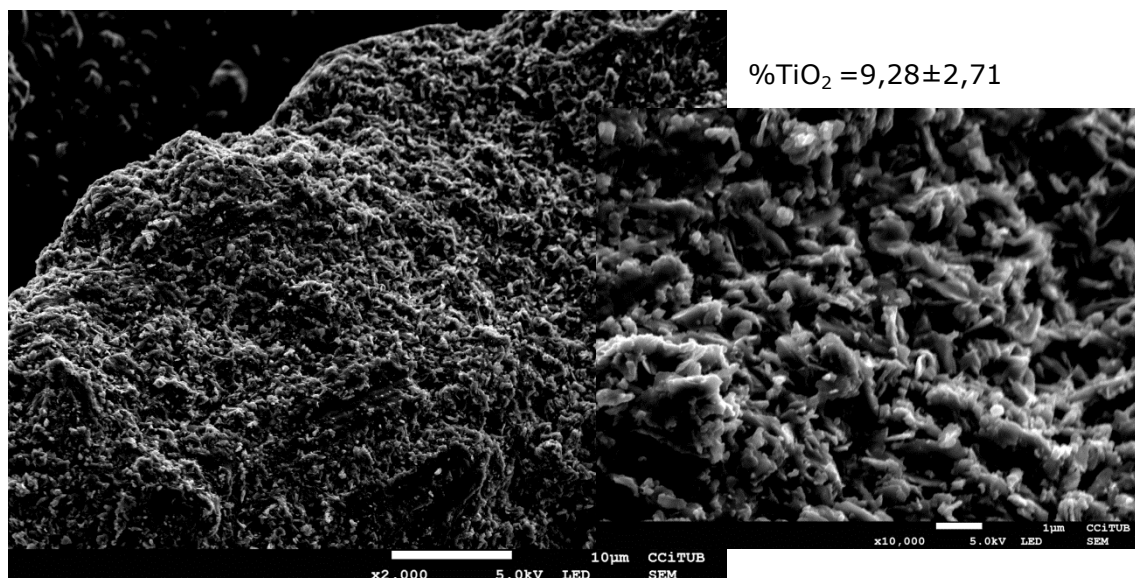


Figura 35. Imágenes SEM de la muestra G8(4.D.TW).

Esta última imagen (figura 35) se corresponde a la muestra de vidrio en que se utilizó Tween® 20 como surfactante. Aunque no se aprecia una monodispersión clara sí que se observan aglomeraciones más pequeñas y con una morfología algo distinta a las anteriores, ya que no tienen una apariencia tan redondeada. Se intuyen partículas de posible tamaño nanométrico monodispersas pero no de forma clara, ya que esta imagen fue tomada con un SEM y su calidad es menor que las anteriores. Esta muestra también tiene un porcentaje de TiO_2 elevado por lo que, como ocurre en la muestra con PVA, no se puede concluir si esta aparente mayor estabilidad es debida a la adición del surfactante o al alto contenido en TiO_2 .

4.3. Tamaño

Para intentar obtener un valor aproximado del tamaño de las partículas de las muestras de vidrios de fosfato de calcio sintetizado se utilizó un análisis DLS. En la tabla 4 se resumen los resultados:

Tabla 4. Tamaños de las muestras obtenidos por DLS.

| | Tamaño (nm) | Desviación estándar |
|---------|----------------|------------------------|
| G8(2.D) | 455,0 | 50,3 |
| G8(4.D) | 463,1 | 49,5 |
| G8(6.D) | 336,6 | 47,6 |

| | | |
|-------------|-------|------|
| G8(4.C) | 743,1 | 49,7 |
| G8(4.A) | 324,2 | 66,1 |
| G8(4.T) | 399,1 | 3,2 |
| G8(4.Ac) | 831,5 | 40,0 |
| G8(4.D.TX) | 234,4 | 34 |
| G8(4.D.TW) | 313,8 | 6,3 |
| G8(4.D.PVA) | 516,6 | 45,4 |

Hay que tener en cuenta que aunque los resultados de esta técnica se obtienen a partir de cálculos estadísticos de picos de intensidad de la distribución de tamaño y que aunque en el momento del análisis las partículas se encuentran dispersas en etanol siguen quedando aglomeraciones de las mismas que distorsionan los resultados.

Los tamaños de las partículas de las muestras en que se varió el tiempo de la etapa de envejecimiento se pueden observar gráficamente en la figura 36:

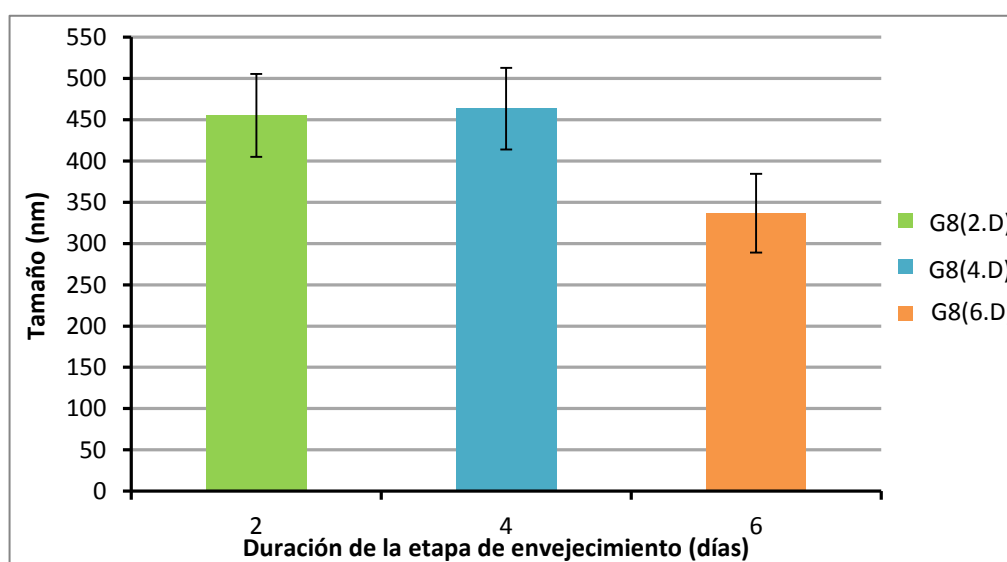


Figura 36. Tamaños de las nanopartículas de G8(2.D), G8(4.D) y G8(6.D).

Tal y como ya se había podido observar en las imágenes del FE-SEM el tamaño de las partículas son muy similares entre las muestras sometidas a 2 y 4 días de envejecimiento. En cambio el tamaño de partícula disminuye significativamente en la muestra sometida a 6 días. Dado que las tres muestras fueron sintetizadas conjuntamente hasta el momento de iniciar la etapa de envejecimiento esta diferencia de tamaños podría deberse a esa variación ya que, además, los tres vidrios tienen prácticamente la misma composición química.

Para las muestras en que se variaron los tipos de dispersantes se comparan sus tamaños de partícula del mismo modo que para la composición química: en función de la densidad (figura 37) y la permitividad relativa de los dispersantes (figura 38).

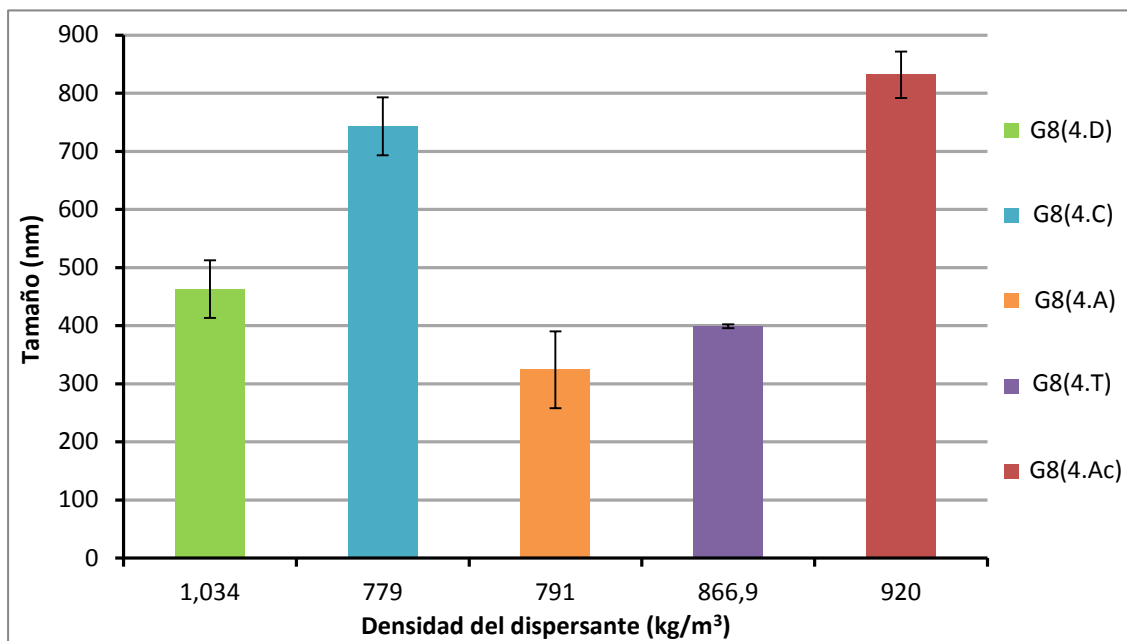


Figura 37. Tamaños de las nanopartículas de G8(4.D), G8(4.C), G8(4.A), G8(4.T) y G8(4.Ac) en función de la densidad del dispersante.

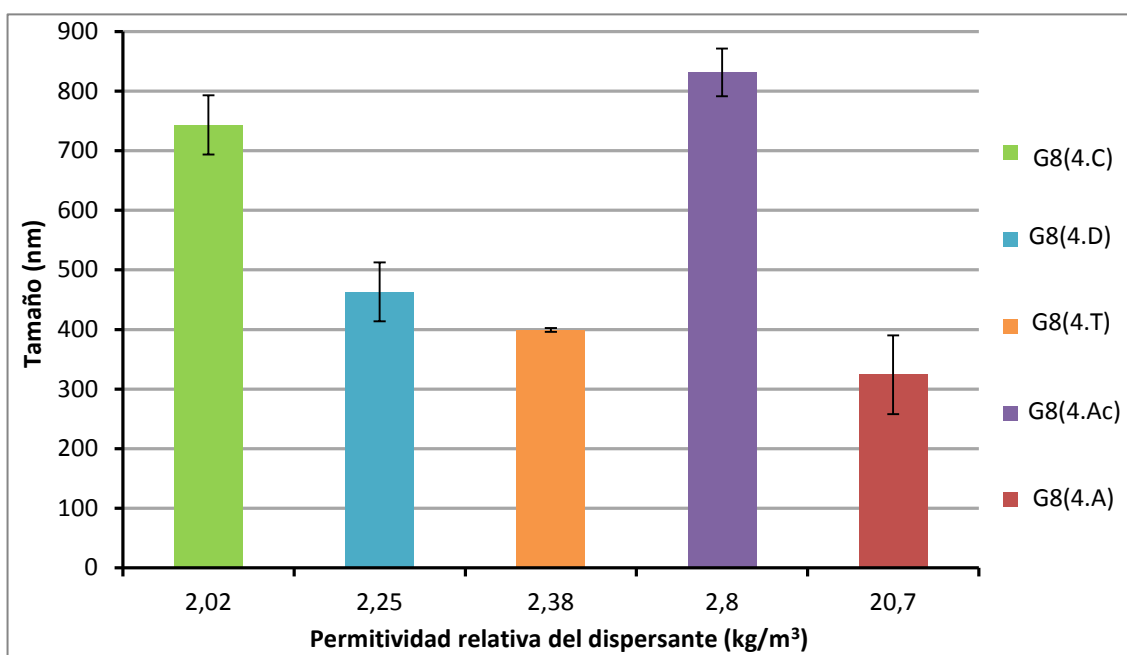


Figura 38. Tamaños de las nanopartículas de G8(4.D), G8(4.C), G8(4.A), G8(4.T) y G8(4.Ac) en función de la permitividad relativa del dispersante.

La muestra de G8(4.A) es la que tiene un tamaño de partículas menor, lo que coincide con lo observado en sus imágenes del FE-SEM. Como ya se ha comentado puede deberse a que el alto porcentaje de TiO_2 haya estabilizado su estructura limitando su tamaño. Las muestras de G8(4.C) y G8(4.Ac) deben haber dado valores tan altos de tamaño de partícula por la interferencia de las grandes aglomeraciones e impurezas de posible origen cristalino ya observadas en sus imágenes del FE-SEM. Como ya ocurría con la composición química, no se

ve una posible relación entre las densidades y permitividades relativas de los dispersantes y el tamaño de las partículas.

Finalmente en la figura 38 podemos observar los tamaños de partícula de las muestras en que se añadieron surfactantes:

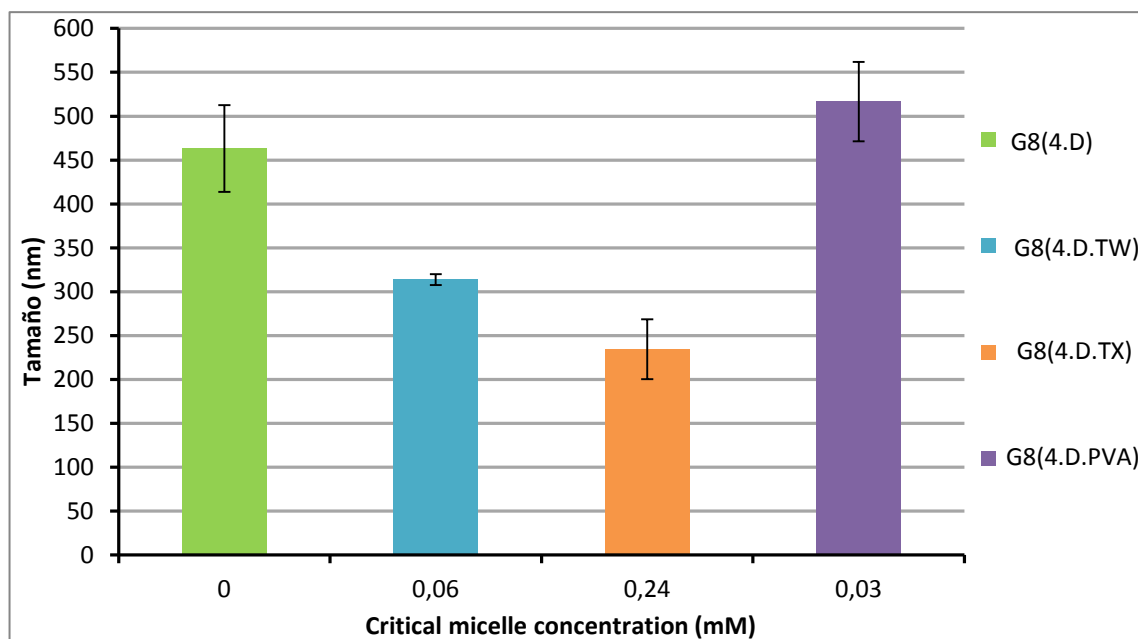


Figura 39. Tamaños de las nanopartículas de G8(4.D), G8(4.D.TX), G8(4.D.TW) y G8(4.D.PVA) en función del CMC del surfactante.

Aunque en las imágenes de la muestra de G8(4.D.PVA) se ha observado una mayor dispersión de las partículas y aglomeraciones más pequeñas las aglomeraciones grandes deben haber interferido en la medida del tamaño de partículas por técnica DLS. En cambio se observa una clara disminución del tamaño de partícula en el caso de la muestra G8(4.D.TX) muy probablemente debido a la adición del Triton® X-100 durante su síntesis como ya se ha podido ver en sus imágenes del FE-SEM. Aunque los resultados para el tamaño de partícula en el caso de la muestra G8(4.D.TW) son algo más altos que en el anterior también puede deducirse que es gracias al efecto de la adición de Tween® 20, aunque habría que confirmarlo realizando más ensayos con los que ajustar la composición, ya que en este caso el porcentaje de TiO₂ es mucho más elevado que en el caso de la muestra G8(4.D.TX). No se observa una relación clara entre el índice CMC de los surfactantes y el tamaño de las partículas.

Aunque los valores obtenidos a partir de la técnica DLS no nos pueden proporcionar valores exactos del tamaño de partícula debido a interferencias por las aglomeraciones no dispersas si puede saberse que muestras contienen partículas de mayor o menor tamaño. A pesar de todo, el tamaño ideal de partícula para poder hablar de nanopartículas debería encontrarse en el rango de 50-100nm.

4.4. Presencia de fases cristalinas

Ciertos análisis de caracterización llevados a cabo en este proyecto solo se han hecho para ciertas muestras, ya que con los resultados de la composición

química, morfología y tamaño se escogieron los vidrios sintetizados que son significativos en algunos de estos parámetros. Las muestras que se decidieron seguir estudiando son G8(2.D), G8(4.D), G8(6.D), G8(4.D.TX), G8(4.D.TW), y G8(4.D.PVA). Se decidió que de los vidrios obtenidos con dispersantes distintos del 1,4-dioxano no se realizara un análisis XRD, ya que con los primeros resultados se observó que no podrían aportar mejoras ni en la estructura ni en la funcionalidad de las nanopartículas.

En las siguientes figuras (40, 41, 42, 43, 44 y 45) se muestran los difractogramas de dichos vidrios en los que se ven ciertos picos de intensidad que muestran fases cristalinas. Con la ayuda de una base de datos en la que hay registrados los ángulos de difracción conocidos de ciertas fases cristalinas y sabiendo posibles compuestos que se pudieron formar durante la etapa de envejecimiento, en función de los elementos de los precursores, se realizó una fase de identificación de los picos de mayor intensidad.

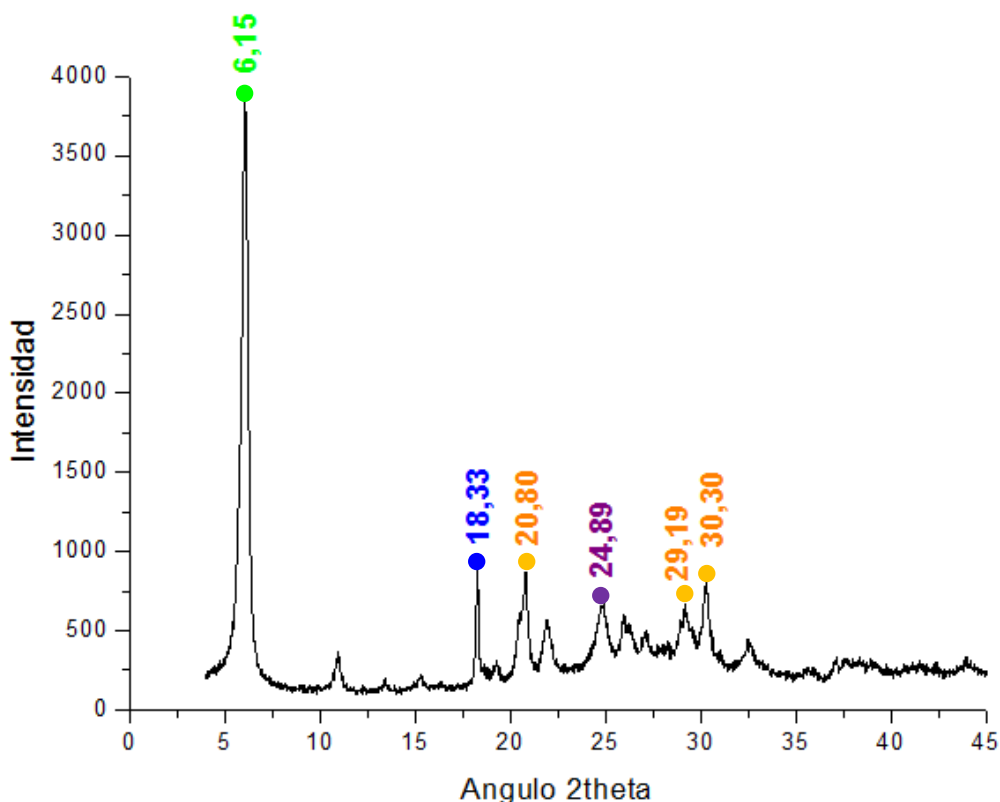


Figura 40. Difractograma G8(2.D).

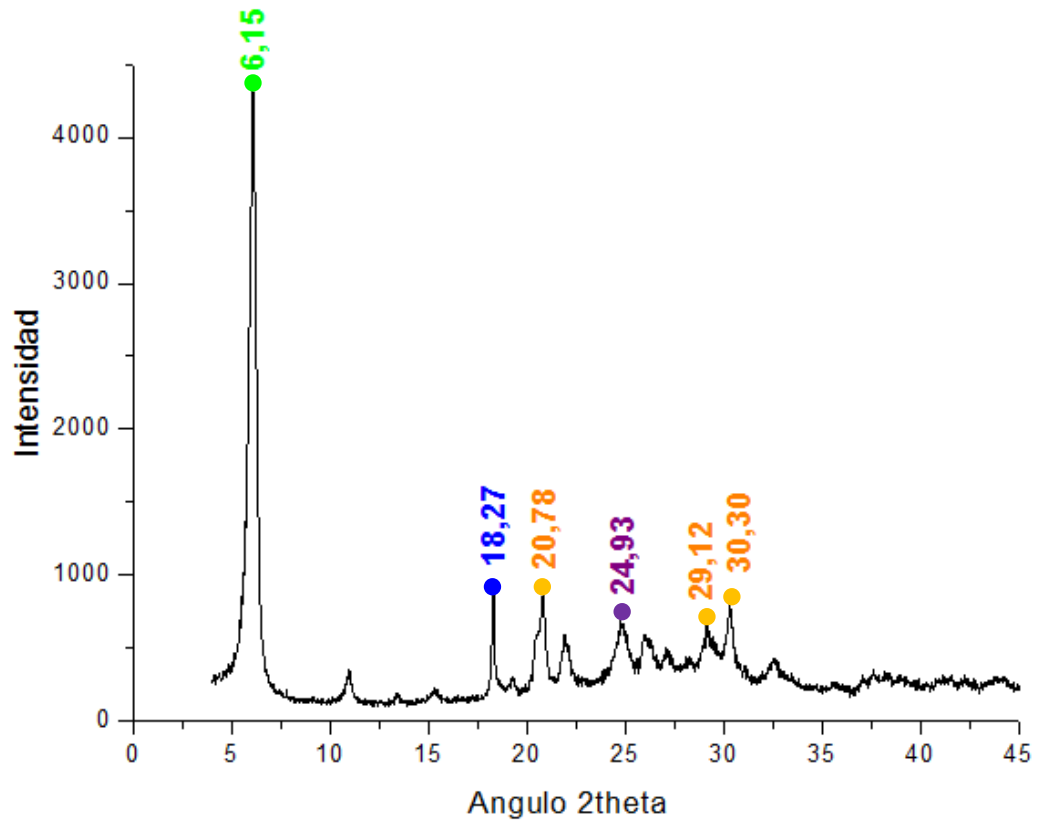


Figura 41. Difractograma G8(4.D).

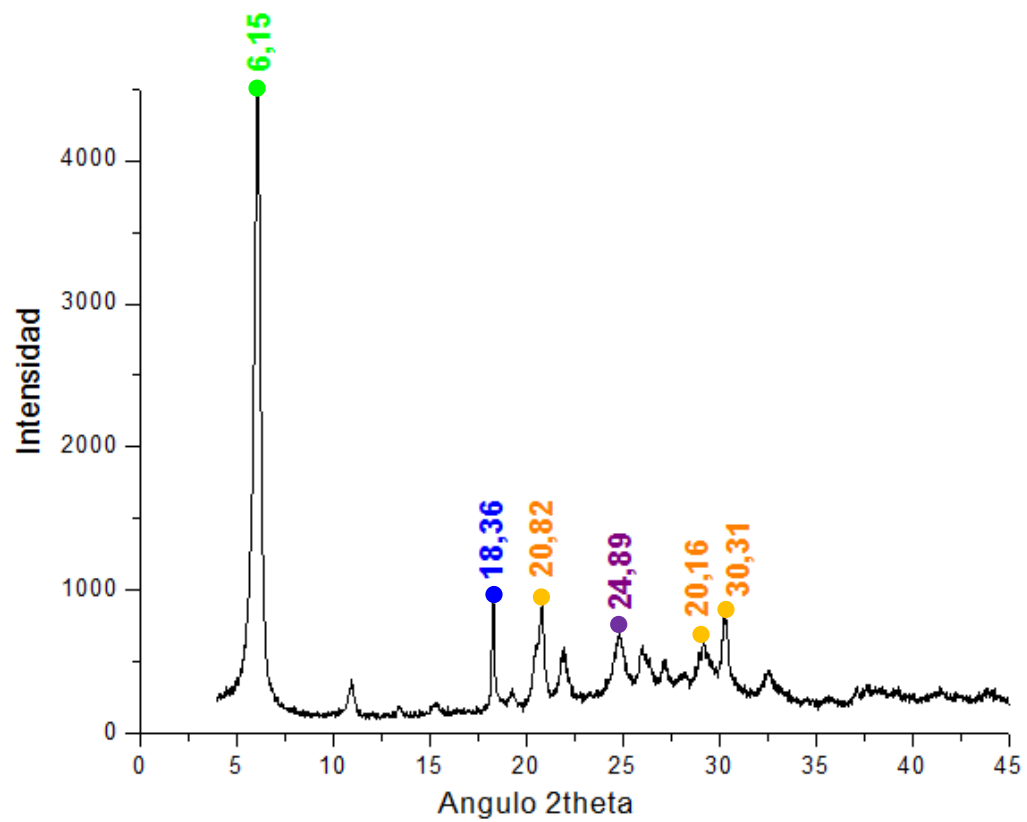


Figura 42. Difractograma G8(6.D).

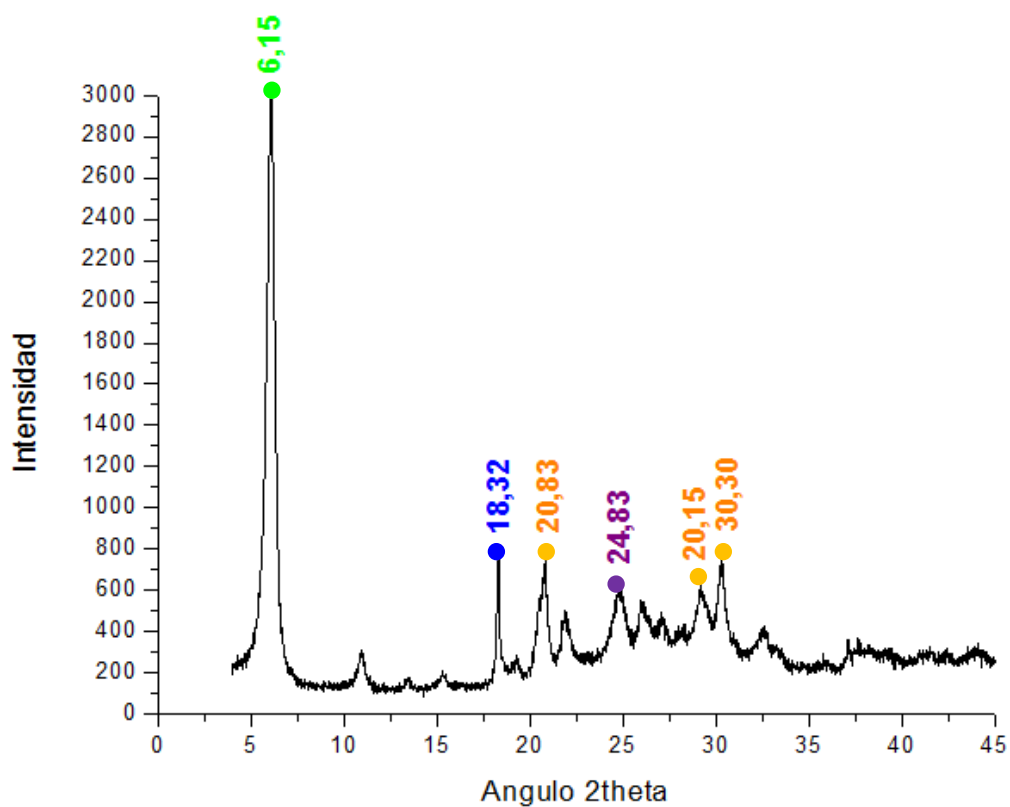


Figura 43. Difractograma G8(4.D.TX).

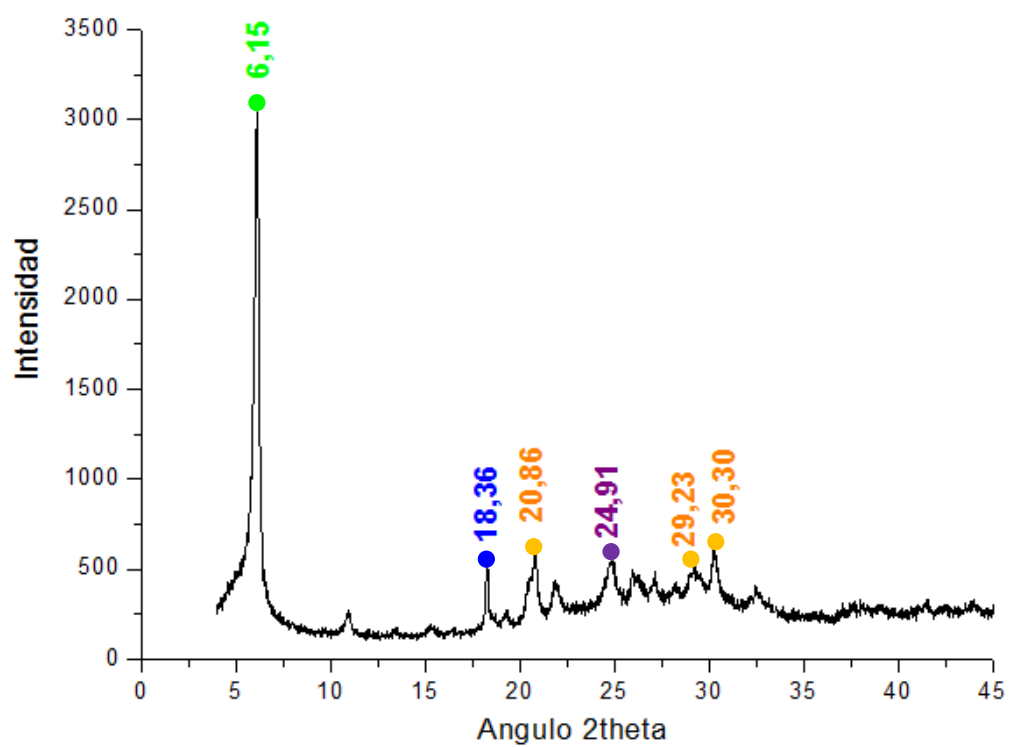


Figura 44. Difractograma G8(4.D.TW).

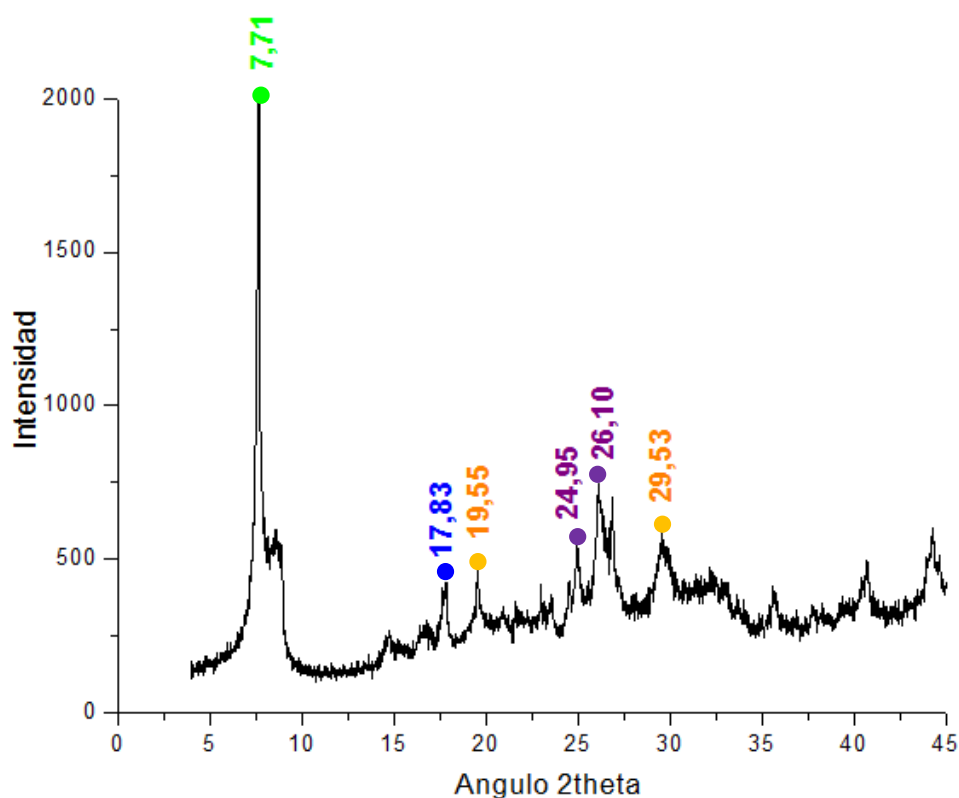


Figura 45. Difractograma G8(4.D.PVA).

Las fases cristalinas identificadas según la base de datos han sido las siguientes:

- $\text{Ca}(\text{MeO})_2$ (●): Se especuló que al tratarse de un ángulo 2θ tan pequeño es muy probable que se trate de algún tipo de compuesto orgánico, a pesar que no aparece en ninguna base de datos.
- Bruxita ($\text{CaPO}_3(\text{OH}) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (●) según la referencia PDF09-0077.
- CaTi_2O_5 (●) según la referencia PDF44-1481.
- $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (●) según la referencia PDF25-1450.

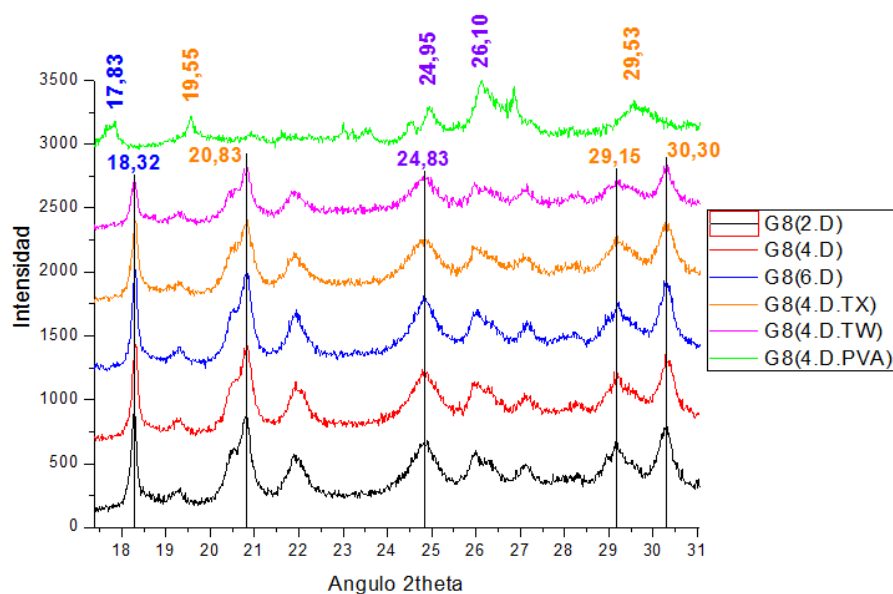


Figura 46. Difractograma de comparación.

En el anterior difractograma (figura 46) se observa más claramente que las fases cristalinas identificadas se reproducen en todas las muestras exactamente igual, excepto en la muestra de G8(4.D.PVA). En esta se ha identificado una fase cristalina más de CaTi_2O_5 muy probablemente debido a que tiene un porcentaje de TiO_2 mucho mayor que los otros vidrios. También cabe destacar que la posible impureza de origen orgánico tiene una intensidad mayor en las muestras G8(2.D), G8(4.D) y G8(6.D) que en el resto.

Comentar que el pico de mayor intensidad de los difractogramas que se ha identificado como impureza de origen orgánico puede ser debido a que en el momento de las reacciones de condensación que suceden en la etapa de envejecimiento (apartado 2.5) no se han completado. Es decir que no se ha completado la sustitución de los radicales OR en la red vítrea por los átomos de Ca, P y Ti. Para cuantificar la materia orgánica presente en las muestras se podrían realizar análisis de termogravimetría. De esta manera se determinaría en que cantidad se encuentra la materia orgánica confirmando lo sugerido con el análisis XRD.

Gracias a este análisis se puede comprobar que las muestras tienen una estructura bastante amorfa pero las impurezas de fase cristalina que se generan en la etapa de envejecimiento afectan sobre todo a la degradabilidad de las partículas, ya que cuanto más amorfo sea el material mayor degradabilidad tendrá.

4.5. Carga superficial

El valor de las cargas superficiales de los vidrios sintetizados se resume en la siguiente tabla 5:

Tabla 5. Potencial Z de los vidrios sintetizados.

| | PZ (mV) | Desviación estándar |
|-------------|------------|------------------------|
| G8(2.D) | 29,8 | 1,8 |
| G8(4.D) | 32,0 | 1,0 |
| G8(6.D) | 32,2 | 1,4 |
| G8(4.C) | 38,8 | 1,0 |
| G8(4.A) | 32,6 | 0,6 |
| G8(4.T) | 29,5 | 1,1 |
| G8(4.Ac) | 35,1 | 1,7 |
| G8(4.D.TX) | 35,1 | 1,9 |
| G8(4.D.TW) | 30,4 | 1,2 |
| G8(4.D.PVA) | 34,1 | 1,3 |

Puede observarse claramente que todos los vidrios tienen una carga superficial positiva y elevada lo que, como ya se ha explicado (apartado 3.2.5), debería evitar la aglomeración entre partículas ya que altos valores de potencial zeta (tanto negativos como positivos) induce su repulsión.

Se considera que para valores de carga superficial positiva a partir de 30mV el sistema es estable y se propicia la no aglomeración de las partículas [39]. No obstante, otras fuentes hablan de un valor de unos 60mV. Esta controversia deja claro que no es un valor universal.

Por lo tanto con la composición química dada de los distintos vidrios y su tratamiento durante la síntesis se ha conseguido unos valores de potencial zeta adecuados. Una causa posible de estos altos valores de carga superficial sería la presencia de materia orgánica en los vidrios, que como se ha visto en los difractogramas (apartado 4.4) es muy posible que existan impurezas de origen orgánico.

En las siguientes figuras (47, 48, 49) se muestran visualmente los valores de carga superficial de los vidrios, en las que se señala el valor de carga positiva a partir del cual se consideran estables los sistemas.

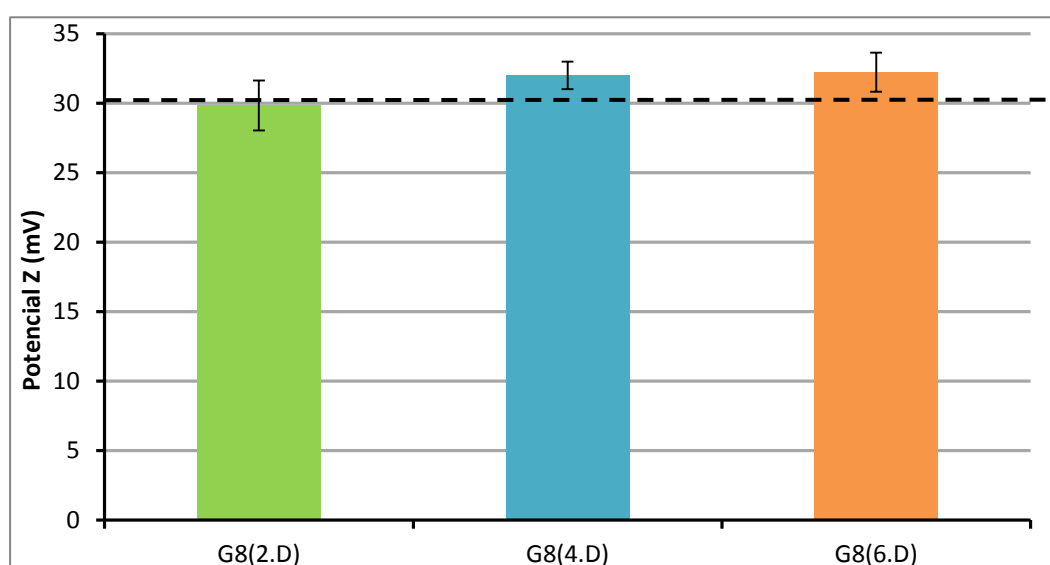


Figura 47. Carga superficial de los vidrios G8(2.D), G8(4.D) y G8(6.D).

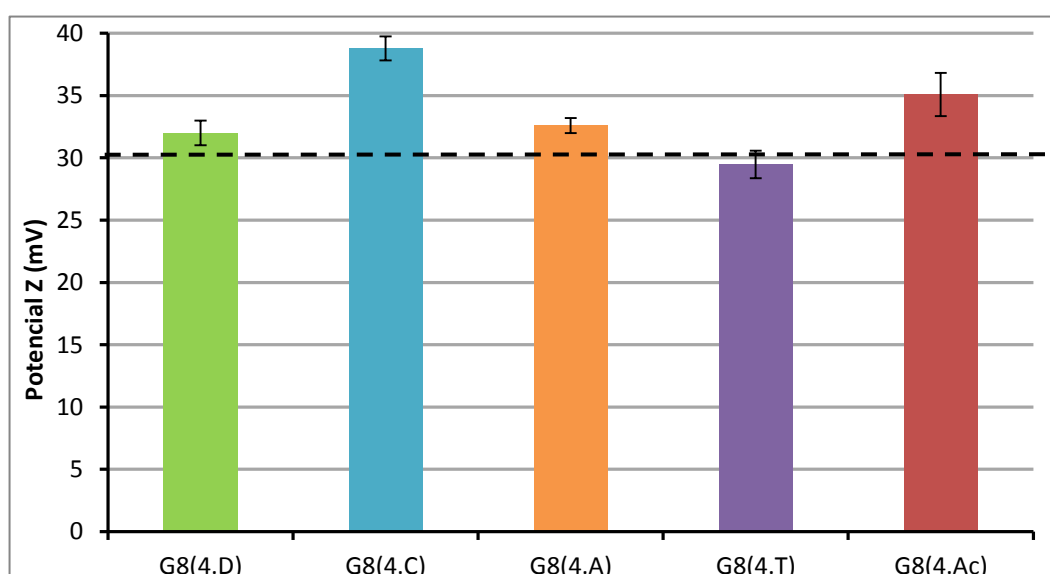


Figura 48. Carga superficial de los vidrios G8(4.D), G8(4.C), G8(4.A), G8(4.T) y G8(4.Ac).

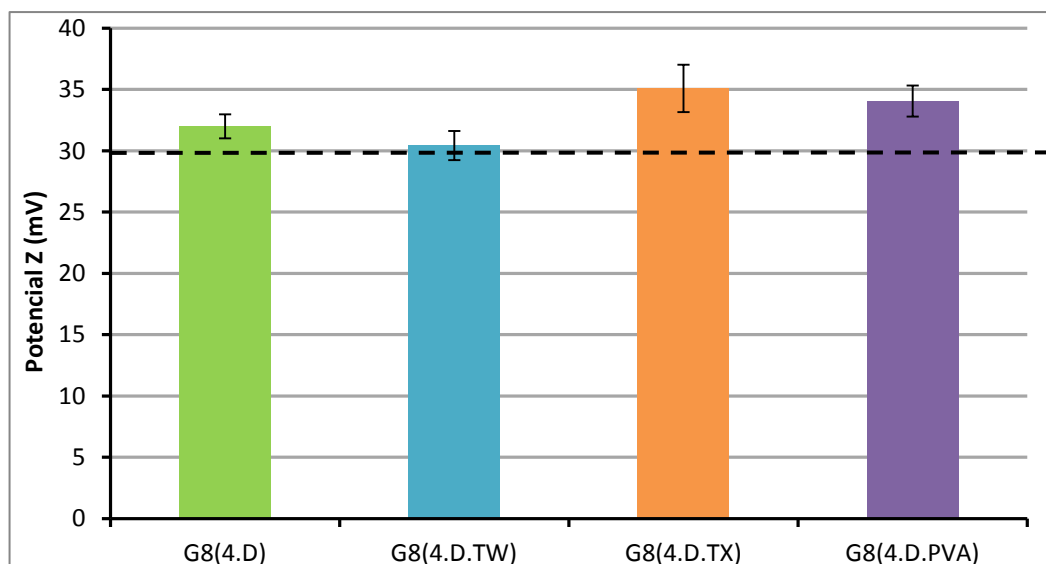


Figura 49. Carga superficial de los vidrios G8(4.D), G8(4.D.TX), G8(4.D.TW) y G8(4.D.PVA).

Como ya se ha comentado en el apartado anterior, se escogió estudiar con más detenimiento ciertos vidrios. Los cuales fueron en los que se aplicaron las variaciones de tiempo de envejecimiento y en los que se añadió surfactante. Por ello los valores de carga superficial más significativos son sus correspondientes y se puede observar que todos ellos se encuentran en valores de 30mV o superiores, el más elevado de los cuales es el del vidrio G8(4.D.TX) que coincide con el más monodisperso según sus imágenes del FE-SEM y con el que contiene partículas de tamaño más pequeño según el análisis DLS.

4.6. Temperatura de transición vítrea (T_g)

Se realizaron análisis DSC de todas las muestras, excepto del vidrio G8(4.A) debido a que ya no quedaba suficiente muestra. A pesar de ello no fue posible sacar grandes conclusiones con esta técnica, ya que se observó una clara relación entre la presencia de TiO_2 en los vidrios y los resultados. Las muestras con bajo porcentaje en TiO_2 , es decir, en G8(2.D), G8(4.D), G8(6.D), y G8(4.D.TX) no mostraron nada en sus diagramas, de manera que no se ha podido determinar su temperatura de transición vítrea. A modo de ejemplo, en la figura 50 se muestra el diagrama de G8(4.D.TX) que es prácticamente idéntico a los de los demás vidrios con poco porcentaje de TiO_2 . Se puede observar que su comportamiento durante el ensayo muestra una apariencia como si no hubiese vidrio en el portamuestras de aluminio, por lo que más tarde se comprobó que al abrir dichos portamuestras ya no quedaban restos de polvo.

Con las curvas del DSC obtenidas de las muestras con alto porcentaje de TiO_2 se ha intentado determinar la temperatura de transición vítrea (T_g), que como ya se ha explicado (apartado 3.2.6) es un parámetro característico de los sólidos amorfos. Dado que se ha observado que existe una clara relación entre los resultados de este análisis y la presencia de TiO_2 . A pesar de todo la única curva DSC que muestra la T_g es la de la muestra G8(4.D.PVA) (figura 51).

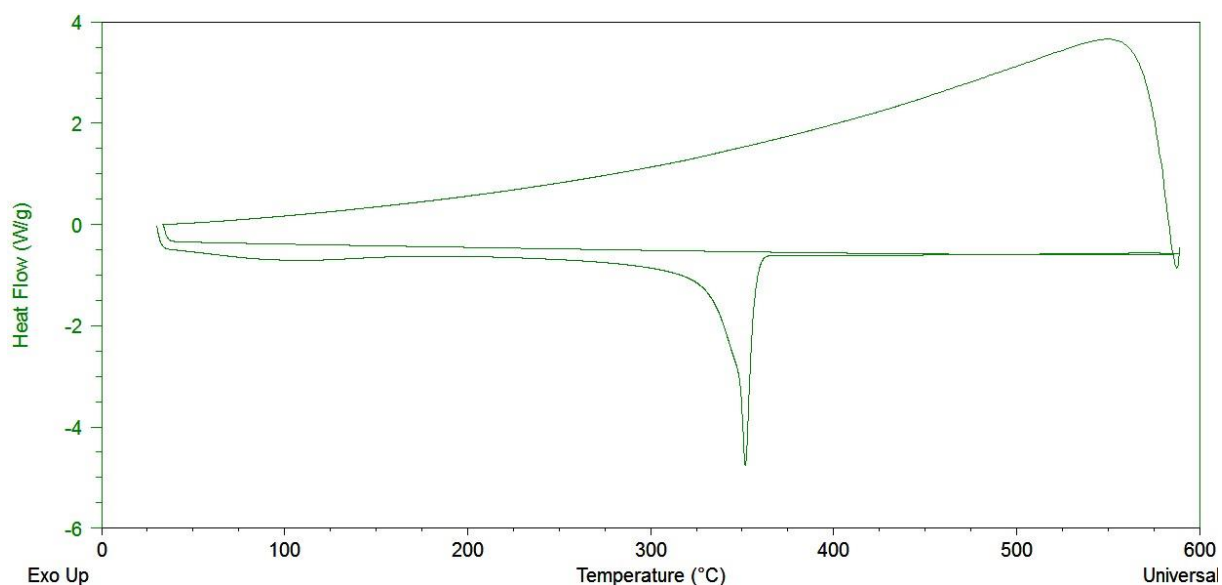


Figura 50. Curva DSC de la muestra G8(4.D.TX).

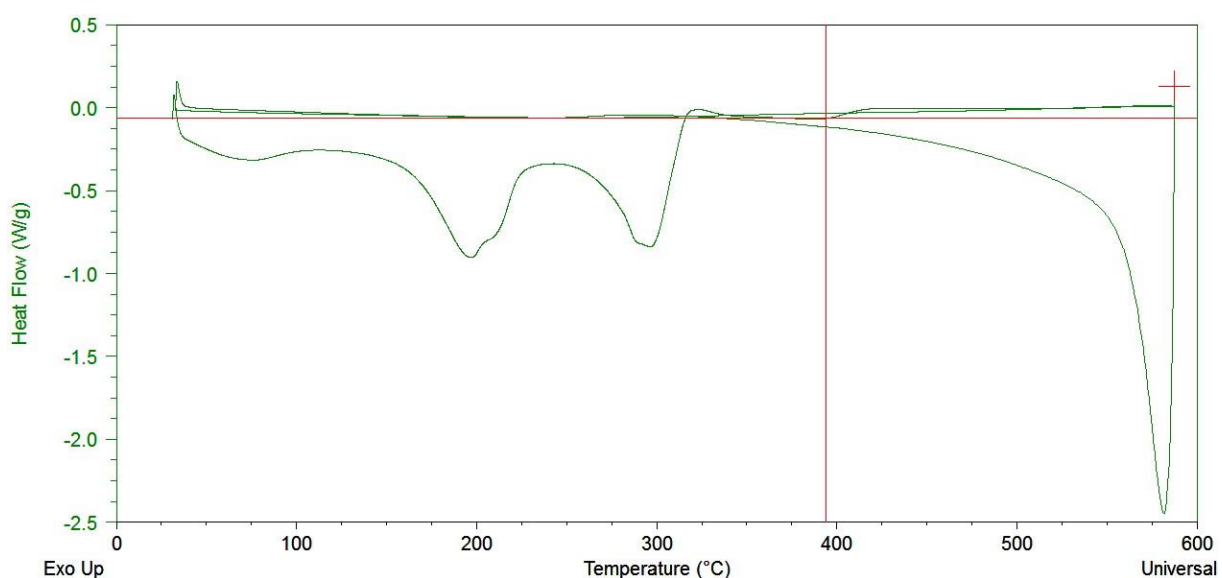


Figura 51. Curva DSC de la muestra G8(4.D.PVA) con su T_g .

4.7. Liberación de calcio al medio

Como ya se ha comentado en apartados anteriores solo se estudió en mayor profundidad las muestras de vidrio que mostraron algún indicio de mejora en cuanto a estructura y/o funcionalidad en los resultados obtenidos de composición química, morfología y tamaño.

Los ratios de liberación de calcio se han hecho y calculado para obtener la concentración por cantidad de nanopartículas (mmol/mg) introducidas en un medio sin calcio para 1 hora, 24 horas y 48 horas. Los resultados obtenidos son los que se muestran a continuación (figura 52, 53):

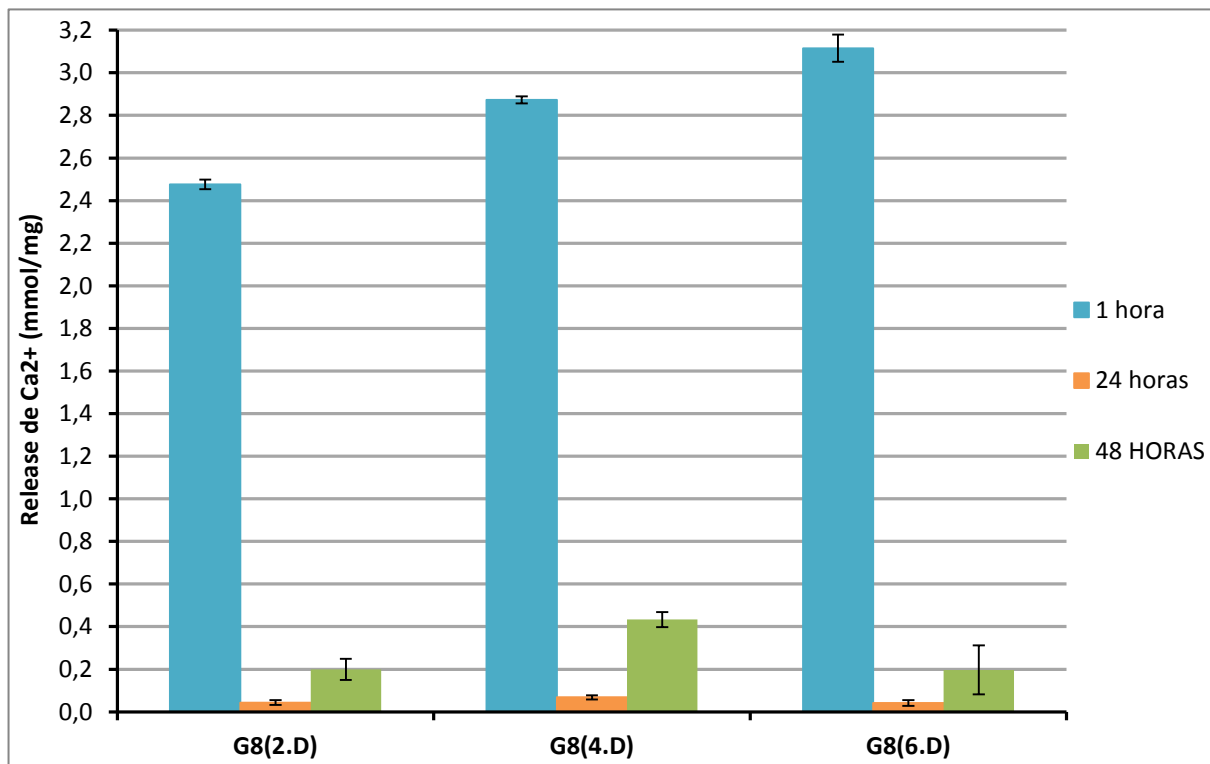


Figura 52. Liberación de $[Ca^{2+}]$ de las muestras G8(2.D), G8(4.D) y G8(6.D).

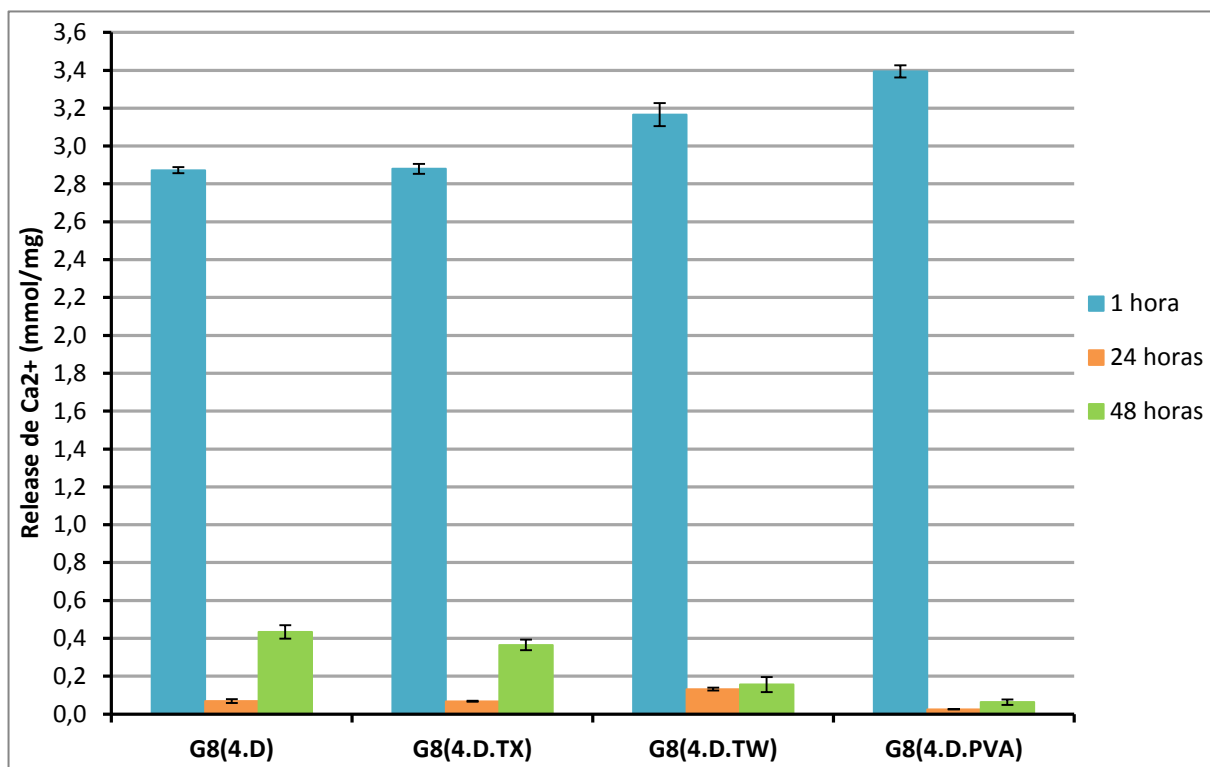


Figura 53. Liberación de $[Ca^{2+}]$ de las muestras G8(4.D), G8(4.D.TX), G8(4.D.TW) y G8(4.D.PVA).

Las variaciones en la liberación de Ca^{2+} pueden deberse a diversos parámetros como el tamaño de partícula y morfología de la muestra, ya que cuanto más pequeñas sean y mayor monodispersadas se encuentren mayor superficie de contacto habrá entre ellas y el medio con el que realizar la liberación del Ca^{2+} .

Como ya se ha comentado anteriormente con los resultados del análisis XRD (apartado 4.4), cuanto más amorfo sea el vidrio más degradable será. Por eso es importante evitar la formación de impurezas de fase cristalina, para que la velocidad de liberación de Ca^{2+} aumente.

Estos factores son los que posiblemente estén causando las diferencias entre las muestras analizadas. En el caso de los vidrios G8(4.D.TW) y G8(4.D.PVA) es muy posible que el haber añadido ese tipo de surfactantes (Tween® 20 y PVA respectivamente) estén disminuyendo la velocidad de degradabilidad de las nanopartículas, con lo que en el primer momento de contacto si se produce una gran liberación de Ca^{2+} pero luego disminuya considerablemente. Para determinar si siguen liberando Ca^{2+} más lentamente que el resto de vidrios pero durante más tiempo sería necesario repetir el proceso y alargar los tiempos de medida. En otros trabajos [1] se ha visto que la incorporación del TiO_2 en la red vítrea disminuye la solubilidad volviendo más sostenida en el tiempo la liberación de calcio al medio. En este caso ambas muestras son las que contienen el mayor porcentaje de TiO_2 (por encima del 9%) y al mismo tiempo son las que tienen una liberación mayor en la primera hora y menor en 24 y 48 horas. Aunque en dichos trabajos se realizó un tratamiento térmico durante la síntesis del material y la proporción entre CaO y P_2O_5 era de 1, factores que influyen en la solubilidad de las nanopartículas y, en consecuencia, en la velocidad de liberación de calcio. Deberían realizarse más ensayos para determinar que está causando estos resultados y si su causa se debe a la composición química, a la adición de PVA y tween® 20 o a ambos.

En el caso del vidrio G8(4.D.TX) hay una liberación de Ca^{2+} más moderado durante la primera hora, como en el caso de la muestra G8(4.D), pero a las 48 horas vuelve a haber un significativo aumento de la liberación de Ca^{2+} . Esto puede significar que en este caso, el Triton® X-100 no esté disminuyendo la velocidad de degradación sino que favorece la liberación algo más controlada que con el resto de vidrios sintetizados con surfactantes.

Para intentar ajustar la velocidad de liberación de las nanopartículas a un perfil más deseado se podrían implementar, por ejemplo, en micropartículas que disminuyeran la velocidad la liberación del Ca^{2+} sin disminuir su degradabilidad.

4.8. pH

Por último, se midieron los pH de los medios en que se hicieron los ensayos de release de Ca^{2+} (apartado 4.8), tal y como puede observarse en la tabla siguiente:

Tabla 6. Medidas de pH de los medios con Ca^{2+}

| | 1 hora | | 24 horas | | 48 horas | |
|---------|--------|-------------|----------|-------------|----------|-------------|
| | pH | Desv. estd. | pH | Desv. estd. | pH | Desv. estd. |
| G8(2.D) | 8,00 | 0,10 | 8,49 | 0,01 | 8,77 | 0,05 |

| | | | | | | |
|-------------|------|------|------|------|------|------|
| G8(4.D) | 8,25 | 0,09 | 8,30 | 0,05 | 8,72 | 0,04 |
| G8(6.D) | 8,33 | 0,06 | 8,74 | 0,05 | 8,84 | 0,04 |
| G8(4.D.TX) | 8,36 | 0,01 | 8,62 | 0,07 | 8,83 | 0,06 |
| G8(4.D.TW) | 8,14 | 0,03 | 8,45 | 0,09 | 8,55 | 0,12 |
| G8(4.D.PVA) | 7,99 | 0,03 | 8,27 | 0,07 | 8,73 | 0,07 |

Los medios con Ca^{2+} liberado de las muestras ensayadas dan como resultado un pH básico. Esto se debe a que no se tamponó el medio sin calcio que se preparó para hacer las medidas de liberación de Ca^{2+} , es decir, no se le añadió una solución tampón para controlar el pH. En el futuro se repetirán los ensayos añadiendo HEPES. No obstante, los valores no han sido todo lo ácidos que se obtienen regularmente con composiciones G5 estudiadas anteriormente, lo que indica que es posible que se vaya por el buen camino.

CAPÍTULO 5:

CONCLUSIONES

Tras la síntesis de las partículas de fosfato de calcio aplicando distintas variables y su correspondiente caracterización se puede llegar a diversas conclusiones.

Como no se consiguió aproximar suficientemente la composición química de los vidrios y se presentaron diferencias significativas entre los porcentajes de TiO_2 de unos a otros, hay ciertos resultados con los que no se puede determinar su causa exacta, ya que existe más de una variable.

De los dispersantes empleados, diferentes al 1,4-dioxano, se ha podido determinar que no han aportado mejoras significativas ni indicios de ellas en cuanto a lo que estructura y funcionalidad de las partículas se refiere. Dado que en los primeros análisis se observó que no ayudaban a limitar el tamaño de partícula, ni a esferificar su morfología, ni a monodispersarlas se decidió no seguir adelante con su caracterización. Además se pudo observar que existían numerosas impurezas de origen probablemente cristalino, con lo que reducirían su capacidad de degradabilidad y, en consecuencia, su liberación de Ca^{2+} al medio.

Con los vidrios que se fabricaron conjuntamente variando únicamente el tiempo de duración de la etapa de envejecimiento se ha podido llegar a ciertas conclusiones. Primero, la duración del envejecimiento (entre 2 y 6 días) no afecta a la composición química ya que los tres materiales presentaban los mismos porcentajes de CaO , P_2O_5 y TiO_2 . Es decir, entre 2 y 6 días se incorporan los mismos átomos de Ca, P y Ti a la red vítrea. Sería necesario repetir las pruebas aproximando las composiciones a la del G8 para confirmar que para porcentajes mayores de TiO_2 tampoco es necesario más tiempo de envejecimiento para asegurar la incorporación del Ti en la red. Con esas repeticiones también se podría comprobar si al aumentar el porcentaje de TiO_2 se mejora la morfología de las partículas, ya que la muestra de G8(6.D) mostraba menos aglomeraciones que las de G8(2.D) y G8(4.D).

En cuanto los vidrios en que se empleó algún surfactante para su síntesis sí que se han observado indicios de alguna mejoría respecto a la muestra de G8(4.D). Aunque se han utilizado tres surfactantes distintos, las muestras en las que se empleó el Triton® X-100 y el Tween® 20 presentaron tamaños de partícula significativamente más reducidos que el resto (234,4 nm y 313,8 nm respectivamente) incluida la muestra con PVA. Ambas presentaron también tener menos impurezas de fase cristalina que la de PVA pero algo más de origen orgánico. Finalmente con el ensayo de liberación de Ca^{2+} se ha podido determinar que la velocidad de liberación de calcio en el medio se presenta más ajustado al perfil deseado en el vidrio G8(4.D.TX) a diferencia de los otros dos, ya que durante la primera hora la liberación es ligeramente más controlada y pasadas 48 horas se sigue liberando una concentración de Ca^{2+} a tener en cuenta.

Finalmente se puede concluir que con este proyecto se han encontrado variables durante el proceso de síntesis de nanopartículas de fosfato de calcio con las que hay que seguir trabajando. Ya que con los resultados de la caracterización, se han observado ciertos indicios con los que se podría llegar a mejorar la estructura, funcionalidad y síntesis de las mismas.

Los resultados obtenidos sugieren que algunas de las modificaciones realizadas durante la síntesis de estas nanopartículas pueden ser factor de mejora, por lo tanto se deben plantear estrategias de estudio con las que intentar resolver problemas observados durante el análisis de la caracterización de los vidrios. Primero se deberían realizar más reajustes en los volúmenes de las soluciones precursoras para aproximar la composición química de todas las muestras a comparar. De esta manera se conseguirían resultados más concluyentes al influir solo el parámetro escogido a modificar. Reajustando el porcentaje de los precursores, disminuyendo el CaO y aumentando el P_2O_5 , se podrían reducir la cantidad de sólidos cristalinos de calcio presentes en el material. Para limitar el tamaño de partícula se debería variar el volumen de surfactante a añadir, sobre todo con el Triton® X-100 dado que ha sido la muestra con mejores resultados, para intentar obtener un mayor número de sistemas de micelas invertidas que eviten las aglomeraciones de nanopartículas. De esa manera se conseguiría aumentar la superficie de contacto entre el vidrio y el medio, favoreciendo la liberación de calcio y la incorporación en los materiales (como el PLA) con los que crear compuestos para su aplicación en el tejido óseo dañado.

También deberían realizarse otros ensayos para la liberación de calcio. Con ello se podría determinar si el calcio liberado en la primera hora se corresponde con la casi totalidad del calcio presente en el ensayo, es decir, que una gran parte del calcio se encuentre en la superficie de las nanopartículas y por eso en tiempos más largos de ensayo prácticamente no se produce liberación de calcio. O, por el contrario, que durante la primera hora se libere solo el calcio contenido en la superficie y el resto (contenido en el interior) tarde mucho más en liberarse por impedimento del alto contenido de TiO_2 y una posible combinación de los surfactantes.

CAPÍTULO 6:

TRATAMIENTO DE

RESIDUOS

Todos los productos químicos peligrosos que se han manipulado durante el desarrollo experimental de este proyecto se han utilizado siguiendo las recomendaciones de los fabricantes y cumpliendo la normativa vigente: manipulándolos dentro de la campana de gases, utilizando guantes, gafas de protección, etcétera.

Los residuos químicos generados de la experimentación se han separado clasificando en diferentes contenedores en función de sus componentes (halogenados y no halogenados) y de su pH (soluciones ácidas y soluciones básicas) para después poder tratarlos según manda la normativa vigente.

Los materiales desechados se han separado en contenedores según si se trataba de residuos sólidos (guantes, jeringuillas, papel sucio, entre otros), residuos punzantes o puntiagudos (agujas, puntas micropipetas, cristales rotos, entre otros), residuos de riesgo biológico y residuos citotóxicos.

Para más especificaciones acerca del tratamiento de residuos en el laboratorio donde se ha llevado a cabo este proyecto (*Institut de Bioenginyeria de Catalunya*) consultar el anexo II.

CAPÍTULO 7:

BIBLIOGRAFÍA

7.1. Referencias bibliográficas

- [1] Navarro Toro, M. Eugenia. 2005. "Desarrollo Y Caracterización de Materiales Biodegradables Para Regeneración Ósea". Universitat Politècnica de Catalunya.
- [2] Nathal y Paredes Méndez, Virginia. 2012. "Caracterización Y Optimización de Superficies Biomiméticas Para Regeneración de Tejido Óseo". Universitat Politècnica de Catalunya.
- [3] Gartner, Leslie P. and James L. Hiatt. 2007. "Texto Atlas de Histología". 3rd ed. Editorial Mc Graw Hill. (USA).
- [4] B. Young, J. W. Heath. 2010 "Wheater's Functional Histology". 4th ed. Editorial Harcourt (Australia). pg 175-183
- [5] Comín M, Peris JL. Comportamiento mecánico del tejido óseo. In: Instituto de Biomecánica de Valencia, editor. Biomecánica de la fractura ósea y técnicas de reparación. Valencia: 1999: 35.
- [6] Barrère, F. 2008. "Advanced biomaterials for skeletal tissue regeneration: Instructive and smart functions". Materials Science and Engineering 59, pg. 38-71.
- [7] Rincón, Esther Rincón, Antonio Ros Felip, and Rafael Claramunt Alonso. 2004. "Caracterización Mecánica Del Material Óseo." Revista D Ciencia, Tecnología Y Medio Ambiente II.
- [8] F. Orgaz, J. Rincon, F.Capel. 1987. "Materiales biocerámicos y biovidrios. Instituto de Cerámica y Vidrio". Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio. 26 (Madrid). pg 13-19.
- [9] David F. Williams. July 2008. "On the mechanisms of biocompatibility". Biomaterials, Volume 29, Issue 20. pg 2941-2953.
- [10] P.Ducheyne. 2011."Biomaterials". Editorial Elsevier. University of Pennsylvania (Philadelphia, PA, USA)
- [11] Larry L. Hench, June Wilson. 1993. "An introduction to bioceramics". Singapore: World Scientific, cop.
- [12] López, M. M. Machado, J. Faure, M. I. Espitia Cabrera, and M. E. Contreras García. 2014. "Desarrollo Estructural Del Biovidrio 45S5 Obtenido Por Sol-Gel Con El Tratamiento Térmico" 3: 3616-3617.

- [13] Cao W, Hench LL. 1996. "Bioactive materials". *Ceram Int* ;22: pg 493–507.
- [14] Navarro Toro, M. Eugenia, Engel, Elisabeth. 2006. "Development of a Biodegradable Composite Scaffold for Bone Tissue Engineering: Physicochemical, Topographical, Mechanical, Degradation, and Biological Properties".
- [15] Gonzalez, Javier Alonso Perez. 2012. "Síntesis de Biovidrios Por La Técnica Sol-Gel Con Incorporación de Metales Y Estudio de Sus Propiedades Antibacteriales". Universidad de Chile.
- [16] Lorenzo Fernández, Sandra. 2013. "Optimización Del Proceso de Fabricación de Partículas de Biovidrio Por Sol-Gel Y Su Aplicación En Materiales Compuestos Biodegradables Para Medicina Regenerativa". Universitat de Barcelona, Universitat Politècnica de Catalunya.
- [17] Castaño, Oscar, Sachot, Nadège, Xuriguera, Elena , Engel, Elisabeth, Planell, Josep A., Jeong-Hui Park, Guang-Zhen Jin, Tae-Hyun Kim, Joong-Hyun Kim, and Hae-Won Kim. 2014. "Angiogenesis in Bone Regeneration: Tailored Calcium Release in Hybrid Fibrous Scaffolds". *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 6 (10), pp 7512–7522.
- [18] Brinker, Jeffrey, and George Scherer. 1990. *Sol-Gel Science. The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*. Academic Press.
- [19] Van Nieuwenhuysse, Thomas. 2011. "Fabricación de Estructuras 3D Para La Regeneración Ósea". Universitat Politècnica de Catalunya.
- [20] Rosen, Milton J. 2004. *Surfactants and Interfacial Phenomena*. 3rd ed. Wiley-Interscience.
- [21] Eastoe, Julian, Martin J Hollamby, and Laura Hudson. 2006. "Recent Advances in Nanoparticle Synthesis with Reversed Micelles." *Advances in Colloid and Interface Science* 128-130 (2006) (December 21): 5–15.
- [22] Iti Som, Kashish Bhatia, Mohd. Yasir. 2012. "Status of surfactants as penetration enhancers in transdermal drug delivery". *Journal of Pharmacy & BioAllied Sciences*. Vol. 4. 2-9
- [23] Kwon, Ji Yean, Hisashi Naito, Takeshi Matsumoto, and Masao Tanaka. "Osteocyte Apoptosis-Induced Bone Resorption in Mechanical Remodeling Simulation – Computational Model for Trabecular Bone Structure."
- [24] Navarro M, Ginebra MP, Clement J, Martinez S, Avila G, Planell JA. 2003. "Physicochemical degradation of titania-stabilized soluble phosphate glasses for medical applications". *J Am Ceram Soc* 86. pg. 1345–1352.
- [25] Navarro M, Ginebra MP, Planell JA. 2003. "Cellular response to calcium phosphate glasses with controlled solubility". *J Biomed Mater Res* 67. pg. 1009-1015.
- [26] Sigma-Aldrich. Data Sheet D201863.
- [27] Sigma-Aldrich. Data Sheet 650501.
- [28] Sigma-Aldrich. Data Sheet 227048.
- [29] Sigma-Aldrich. Data Sheet 244511.
- [30] Mohan, Prasanna K, George Nakhla, and Ernest K Yanful. 2003. "Biodegradability of Surfactants under Aerobic , Anoxic , and Anaerobic Conditions" (700982): 1–5.
- [31] C. Peetla, V. Labhasetwar. 2009. "Effect of Molecular Structure of Cationic Surfactants on Biophysical Interactions of the Surfactant-modified Nanoparticles with a Model Membrane and Cellular Uptake" *The ACS journal of surfaces and colloids. Langmuir*; 25(4): 2369-2377.
- [32] Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. 1974. "Toxicological evaluation of some food additives including anticaking agents, antimicrobials, antioxidants, emulsifiers and thickening agents". WHO Food Additives Series No. 5. World Health Organization.
- [33] Bob Hafner. "Energy Dispersive Spectroscopy on the SEM". University of Minnesota.
- [34] "Fiel Emission SEM". Applied Sciences and Technology Department. Polytechnic of Turin. http://areeweb.polito.it/ricerca/carbongroup/fac_fesem.html (23-05-14)
- [35] "Principios generales de la microscopía electrónica de barrido (SEM)". Laboratorio de microscopía FE-SEM. Instituto de Ciencia de Materiales de Madrid. http://www.icmm.csic.es/divulgacion/posters/TEC_microscopia%20Electronica%20de%20Barrido.pdf (23-05-14).
- [36] Manual Malvern Instruments Zsizer/Particlesize.

- [37] Enciclopedia FRITSCH <http://www.fritsch-sizing.es/enciclopedia/dispersion-de-luz-dinamica/> (23-05-14).
- [38] https://www.upc.edu/sct/ca/fotos_equipment/i_604_cimg1291_new.jpg (06-06-14)
- [39] <http://www.ehu.es/imacris/PIE06/web/DRXP.htm> (06-06-14)
- [40] http://personales.unican.es/aguadof/TecexpV_archivos/Practica-B1.pdf (06-06-14)
- [41] Contreras, Blandine. 2009. "Biodegradable Nanostructured Hybrid Materials for Bone Regeneration Implants". Universitat Politècnica de Catalunya.
- [42] González, Laura Corredor. 2012. "Electrospun Nanofibers with Embedded Ca / P Nanoparticles for Angiogenesis Promotion in Skin and Bone Regeneration". Universitat de Barcelona.
- [43] <http://pslc.ws/macrog/tg.htm> (23-05-14)
- [44] <http://www.tainstruments.com/product.aspx?siteid=11&id=11&n=1> (24-05-14)
- [45] O-Cresolphthalein Complexone Method
- [43] <http://chem.wisc.edu/deptfiles/genchem/lab/labdocs/modules/phmeter/pHdesc.htm> (24-05-14)
- [46] Bagwe, Rahul P, Chaoyong Yang, Lisa R Hilliard, and Weihong Tan. 2004. "Optimization of Dye-Doped Silica Nanoparticles Prepared Using a Reverse Microemulsion Method." *Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids* 20 (19) (September 14): 8336–42.
- [47] Bagwe, Rahul P, Chaoyong Yang, Lisa R Hilliard, and Weihong Tan. 2004. "Optimization of Dye-Doped Silica Nanoparticles Prepared Using a Reverse Microemulsion Method." *Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids* 20 (19) (September 14): 8336–42.
- [48] Santra, Swadeshmukul, Rovelyn Tapeç, Nikoleta Theodoropoulou, Jon Dobson, Arthur Hebard, and Weihong Tan. 2001. "Synthesis and Characterization of Silica-Coated Iron Oxide Nanoparticles in Microemulsion : The Effect of Nonionic Surfactants" (18): 2900–2906.
- [49] Takasu, Akinori, Shigeki Ohmori, Yutaka Yamauchi, and Tadamichi Hirabayashi. 2002. "Micellar Polymerization of Amphiphilic Poly(vinyl Alcohol) Macromonomer Having a Methacrylate End Group Prepared by Aldol-Type Group-Transfer Polymerization." *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 40 (24) (December 15): 4477–4484.

7.2. Bibliografía de Consulta

- Ballarre, J. 2008. "Recubrimientos Bioactivos Nanoestructurados Realizados Por Sol-Gel Sobre Acero Inoxidable Para Su Uso En Cirugía Ortopédica" (1): 16–17.
- Cabrera, Julieta, Carol Paredes, Edwin Urdy, and Julio Santiago. 2007. "Preparación Y Caracterización de Películas de Alcohol Polivinílico Conteniendo Nanopartículas de TiO₂" 8 (4): 323–332.
- Domínguez, Ana, Aurora Fernández, Noemí González, Emilia Iglesias, and Luis Montenegro. 1997. "Determination of Critical Micelle Concentration of Some Surfactants by Three Techniques" 74 (10): 1227–1231.
- Dong, X., D. Potter, and C. Erkey. 2002. "Synthesis of CuS Nanoparticles in Water-in-Carbon Dioxide Microemulsions." *Industrial & Engineering Chemistry Research* 41 (18) (September): 4489–4493.
- Estrada, Catalina, Ana Cristina Paz, and Luis Ernesto López. 2006. "Ingeniería de Tejido Óseo: Consideraciones Básicas." *EIA*: 93–100.
- Gonzalez, Javier Alonso Perez. 2012. "Síntesis de Biovidrios Por La Técnica Sol-Gel Con Incorporación de Metales Y Estudio de Sus Propiedades Antibacteriales". Universidad de Chile.
- Kwon, Ji Yean, Hisashi Naito, Takeshi Matsumoto, and Masao Tanaka. 2012. "Osteocyte Apoptosis-Induced Bone Resorption in Mechanical Remodeling Simulation – Computational Model for Trabecular Bone Structure." *Intech*.
- Lu, Wenbo, Rui Ning, Xiaoyun Qin, Yingwei Zhang, Guohui Chang, Sen Liu, Yonglan Luo, and Xuping Sun. 2011. "Synthesis of Au Nanoparticles Decorated Graphene Oxide Nanosheets: Noncovalent Functionalization by TWEEN 20 in Situ Reduction of Aqueous Chloroaurate Ions for

Hydrazine Detection and Catalytic Reduction of 4-Nitrophenol.” *Journal of Hazardous Materials* 197 (December 15): 320–6.

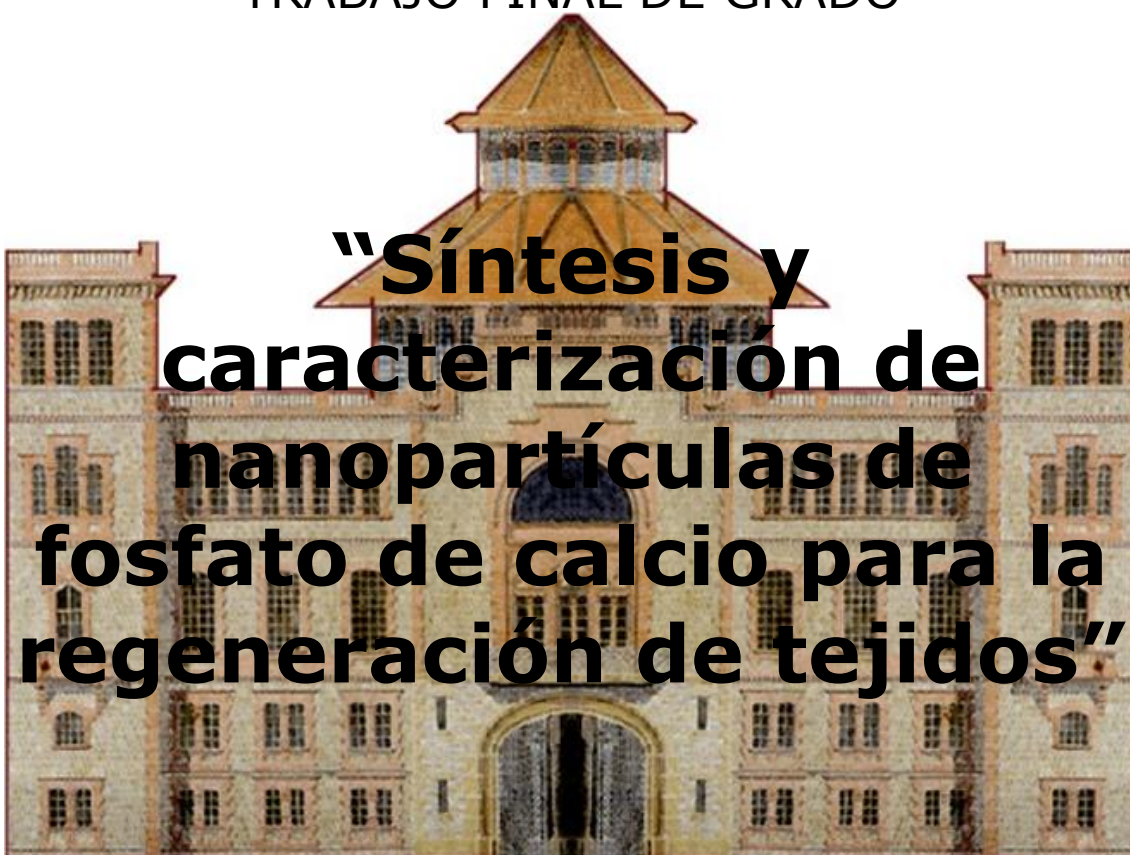


Escola Universitària d'Enginyeria
Tècnica Industrial de Barcelona
Consorci Escola Industrial de Barcelona

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA

Anexo I

TRABAJO FINAL DE GRADO



TFG presentado para optar al título de GRADO en
INGENIERÍA BIOMÉDICA
Por **Maya Toribio Olea**

Barcelona, 11 de Junio de 2014

Director: Oscar Castaño Linares
Departamento de Ciencia de los Materiales e Ingeniería Metalúrgica (CMEM)
Universitat Politècnica de Catalunya (UPC)

ÍNDICE ANEXO I

| | |
|---------------------------------------------------------------------|----|
| Índice anexo I | 72 |
| Anexo I | 73 |
| I. Cálculos previos a la síntesis de G8 | 73 |
| i. <i>Síntesis de los precursores alcóxidos</i> | 73 |
| ii. <i>Concentración de las soluciones de los precursores</i> | 74 |
| iii. <i>Destilación de los dispersantes</i> | 75 |
| iv. <i>Preparación del catalizador básico</i> | 76 |
| II. Cálculos para la síntesis de G8 | 76 |
| i. <i>Volúmenes de los precursores</i> | 76 |
| ii. <i>Volumen de dispersante</i> | 77 |
| iii. <i>Volumen del catalizador básico</i> | 77 |
| iv. <i>Volumen de los surfactantes</i> | 77 |
| III. Cálculos para el calcium release | 78 |
| i. <i>Medio sin Ca^{2+}</i> | 78 |
| ii. <i>Solución HCl:</i> | 78 |
| iii. <i>AMP Buffer</i> | 78 |
| iv. <i>Colour reagent</i> | 78 |
| v. <i>Recta de calibración</i> | 79 |
| vi. <i>Liberación de liberación de calcio en el medio</i> | 80 |

ANEXO I

En este documento se presentan los cálculos que ha sido necesario desarrollar en este proyecto.

I. Cálculos previos a la síntesis de G8

i. Síntesis de los precursores alcóxidos

- Solución de CaO [1M]:

$$250\text{ml sol.} \cdot \frac{1\text{mol Ca}^+}{1000\text{ml sol.}} \cdot \frac{40,078\text{g Ca}^+}{1\text{mol Ca}^+} \cdot \frac{100}{99} = 10,12\text{g Ca}^+$$

$$10,12\text{g Ca}^+ \cdot \frac{1\text{cm}^3}{1,55\text{g Ca}^+} \cdot \frac{1\text{ml}}{1\text{cm}^3} = 6,529\text{ml Ca}^+$$

$$250\text{ml} - 6,529\text{ml} = 243,471\text{ml} \approx 243,5\text{ml 2-MeOEtOH}$$

- Solución de P₂O₅ [2M]:

$$50\text{g P}_2\text{O}_5 \cdot \frac{1\text{mol P}_2\text{O}_5}{141,94467\text{g P}_2\text{O}_5} \cdot \frac{1000\text{ml sol.}}{2\text{mol P}_2\text{O}_5} = 176,1\text{ml} = 176\text{ml sol. P}_2\text{O}_5$$

Se utilizó la cantidad total de P₂O₅ del envase comercial (50g) para evitar el uso de la báscula de precisión *Spartorius CP224S* dentro de la bolsa de guantes.

- Solución de TiO₂ [2M]:

$$50\text{ml sol.} \cdot \frac{2\text{mol Ti}^{4+}}{1000\text{ml sol.}} \cdot \frac{284,26\text{g Ti}^{4+}}{1\text{mol Ti}^{4+}} \cdot \frac{100\text{g C}_{12}\text{H}_{28}\text{O}_4\text{Ti}}{95\text{g Ti}^{4+}} \cdot$$

$$\cdot \frac{1\text{ml}}{0,96\text{g C}_{12}\text{H}_{28}\text{O}_4\text{Ti}} = 31,16\text{ml C}_{12}\text{H}_{28}\text{O}_4\text{Ti}$$

$$50\text{ml} - 31,16\text{ml} = 18,84\text{ml EtOH}$$

ii. Concentración de las soluciones de los precursores

Tabla 7. Masa de los crisoles

| | Masa crisoles vacíos [g] | Masa crisoles con 0,5ml de solución [g] | Masa crisoles después del tratamiento [g] |
|------------------|-----------------------------|-----------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| CaO | 3,8686 | 4,3782 | 3,9008 |
| | 3,7884 | 4,2894 | 3,8231 |
| | 3,6771 | 4,1745 | 3,7098 |
| TiO ₂ | 3,9705 | 4,4156 | 4,0539 |
| | 4,0362 | 4,4837 | 4,1195 |
| | 4,0034 | 4,4500 | 4,0863 |

- Concentración solución CaO:

$$[Ca^{2+}]_1 = \frac{(3,9008-3,8686)g \text{ CaO}}{0,5 \text{ ml sol. CaO}} \cdot \frac{1 \text{ mol CaO}}{56,0774 \text{ g CaO}} \cdot \frac{1000 \text{ ml}}{1 \text{ l}} = 1,13 \text{ M}$$

$$[Ca^{2+}]_2 = \frac{(3,8231-3,7884)g \text{ CaO}}{0,5 \text{ ml sol. CaO}} \cdot \frac{1 \text{ mol CaO}}{56,0774 \text{ g CaO}} \cdot \frac{1000 \text{ ml}}{1 \text{ l}} = 1,23 \text{ M}$$

$$[Ca^{2+}]_3 = \frac{(3,7098-3,6771)g \text{ CaO}}{0,5 \text{ ml sol. CaO}} \cdot \frac{1 \text{ mol CaO}}{56,0774 \text{ g CaO}} \cdot \frac{1000 \text{ ml}}{1 \text{ l}} = 1,15 \text{ M}$$

$$[Ca^+] = \frac{1,13 \text{ M} + 1,23 \text{ M} + 1,15 \text{ M}}{3} = 1,17 \text{ M}$$

$$[Ca^{2+}] = (1,17 \pm 0,06) \text{ M}$$

- Concentración solución TiO₂:

$$[Ti^{4+}]_1 = \frac{(4,0539-3,9705)g \text{ TiO}_2}{0,5 \text{ ml sol. TiO}_2} \cdot \frac{1 \text{ mol TiO}_2}{79,866 \text{ g TiO}_2} \cdot \frac{1000 \text{ ml}}{1 \text{ l}} = 2,09 \text{ M}$$

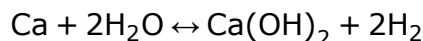
$$[Ti^{4+}]_2 = \frac{(4,1195-4,0362)g \text{ TiO}_2}{0,5 \text{ ml sol. TiO}_2} \cdot \frac{1 \text{ mol TiO}_2}{79,866 \text{ g TiO}_2} \cdot \frac{1000 \text{ ml}}{1 \text{ l}} = 2,08 \text{ M}$$

$$[Ti^{4+}]_3 = \frac{(4,0863-4,0034)g \text{ TiO}_2}{0,5 \text{ ml sol. TiO}_2} \cdot \frac{1 \text{ mol TiO}_2}{79,866 \text{ g TiO}_2} \cdot \frac{1000 \text{ ml}}{1 \text{ l}} = 2,07 \text{ M}$$

$$[Ti^{4+}] = \frac{2,09 \text{ M} + 2,08 \text{ M} + 2,07 \text{ M}}{3} = 2,08 \text{ M}$$

$$[Ti^{4+}] = (2,08 \pm 0,01) \text{ M}$$

iii. *Destilación de los dispersantes*



- Etanol

$$250\text{ml etanol} \cdot \frac{0,789\text{g etanol}}{1\text{ml etanol}} \cdot \frac{0,5\text{g H}_2\text{O}}{100\text{g etanol}} \cdot \frac{1\text{mol H}_2\text{O}}{18\text{g H}_2\text{O}} \cdot \frac{1\text{mol CaH}_2}{2\text{mol H}_2\text{O}} \\ \cdot \frac{42,1\text{g CaH}_2}{1\text{mol CaH}_2} \cdot \frac{1\text{g CaH}_2 \text{ comercial}}{0,90\text{g CaH}_2} = 1,282\text{g CaH}_2 \text{ comercial}$$

Multiplicamos por 2 la cantidad de CaH₂ para asegurar la destilación del etanol:

$$1,282 \cdot 2 = 2,563\text{g} \approx 2,56\text{g CaH}_2$$

- 1,4-dioxano:

$$250\text{ml 1,4dioxano} \cdot \frac{1,034\text{g 1,4dioxano}}{1\text{ml 1,4dioxano}} \cdot \frac{1\text{g H}_2\text{O}}{100\text{g 1,4dioxano}} \cdot \frac{1\text{mol H}_2\text{O}}{18\text{g H}_2\text{O}} \cdot \frac{1\text{mol CaH}_2}{2\text{mol H}_2\text{O}} \\ \cdot \frac{42,1\text{g CaH}_2}{1\text{mol CaH}_2} \cdot \frac{1\text{g CaH}_2 \text{ comercial}}{0,9\text{g CaH}_2} = 3,3589\text{ g CaH}_2 \text{ comercial}$$

Multiplicamos por 2 la cantidad de CaH₂ para asegurar la destilación del 1,4-dioxano:

$$3,3589 \cdot 2 = 6,7178\text{g} \approx 6,7\text{g CaH}_2 \text{ comercial}$$

- Acetona:

$$125\text{ml acetona} \cdot \frac{0,791\text{g acetona}}{1\text{ml acetona}} \cdot \frac{0,5\text{g H}_2\text{O}}{100\text{g acetona}} \cdot \frac{1\text{mol H}_2\text{O}}{18\text{g H}_2\text{O}} \cdot \frac{1\text{mol CaH}_2}{2\text{mol H}_2\text{O}} \\ \cdot \frac{42,1\text{ g CaH}_2}{1\text{mol CaH}_2} \cdot \frac{1\text{g CaH}_2 \text{ comercial}}{0,90\text{ g CaH}_2} = 0,642\text{g CaH}_2 \text{ comercial}$$

Multiplicamos por 2 la cantidad de CaH₂ para asegurar la destilación de la acetona:

$$0,642 \cdot 2 = 1,284\text{g} \approx 1,28\text{g CaH}_2 \text{ comercial}$$

- Ciclohexano:

$$125\text{ml ciclohexano} \cdot \frac{0,779\text{g ciclohexano}}{1\text{ml ciclohexano}} \cdot \frac{0,5\text{g H}_2\text{O}}{100\text{g ciclohexano}} \cdot \frac{1\text{mol H}_2\text{O}}{18\text{g H}_2\text{O}} \\ \cdot \frac{1\text{mol CaH}_2}{2\text{mol H}_2\text{O}} \cdot \frac{42, \text{ g CaH}_2}{1\text{mol CaH}_2} \cdot \frac{1\text{g CaH}_2 \text{ comercial}}{0,90\text{ g CaH}_2} = 0,633\text{g CaH}_2 \text{ comercial}$$

Multiplicamos por 2 la cantidad de CaH_2 para asegurar la destilación de la acetona:

$$0,633 \cdot 2 = 1,266 \text{g} \approx 1,27 \text{g } \text{CaH}_2 \text{ comercial}$$

iv. Preparación del catalizador básico

El catalizador básico utilizado tiene una proporción molar de $60\text{H}_2\text{O}:0,3\text{NH}_3:12\text{EtOH}$.

$$12 \text{mol EtOH} \cdot \frac{46,07 \text{g EtOH}}{1 \text{mol EtOH}} \cdot \frac{100 \text{g sol. EtOH}}{99,5 \text{g EtOH}} \cdot \frac{1 \text{ml sol. EtOH}}{0,79 \text{g sol. EtOH}} =$$

$$= 703,31 \text{ ml sol. EtOH}$$

$$0,3 \text{mol NH}_3 \cdot \frac{17,03 \text{g NH}_3}{1 \text{mol NH}_3} \cdot \frac{100 \text{g sol. NH}_3}{30 \text{g NH}_3} \cdot \frac{1 \text{ml sol. NH}_3}{0,897 \text{g sol. NH}_3} = 19 \text{ml sol. NH}_3$$

Se calcula la cantidad de agua que hay en las soluciones de EtOH y NH_3 para luego quitarlo del volumen calculado de H_2O necesario:

$$19 \text{ml sol. NH}_3 \cdot \frac{0,897 \text{g sol. NH}_3}{1 \text{ml sol. NH}_3} \cdot \frac{70 \text{g H}_2\text{O}}{100 \text{g sol. NH}_3} \cdot \frac{1 \text{mol H}_2\text{O}}{18 \text{g H}_2\text{O}} = 0,66 \text{mol H}_2\text{O}$$

$$703,31 \text{ml sol. EtOH} \cdot \frac{0,79 \text{g sol. EtOH}}{1 \text{ml sol. EtOH}} \cdot \frac{0,5 \text{g H}_2\text{O}}{100 \text{g sol. EtOH}} \cdot \frac{1 \text{mol H}_2\text{O}}{18 \text{g H}_2\text{O}} = 0,15 \text{mol H}_2\text{O}$$

$$(60 - 0,66 - 0,15) \text{mol H}_2\text{O} \cdot \frac{18 \text{g H}_2\text{O}}{1 \text{mol H}_2\text{O}} \cdot \frac{1 \text{ml H}_2\text{O}}{1 \text{g H}_2\text{O}} = 1065,42 \text{ml H}_2\text{O}$$

$$V_T = 703,31 + 19 + 1065,42 = 1787,72 \text{ml}$$

Para preparar 5ml de catalizador básico:

$$5 \text{ml catalizador} \cdot \frac{703,31 \text{ml sol. EtOH}}{1787,72 \text{ml catalizador}} = 1,97 \text{ml EtOH}$$

$$5 \text{ml catalizador} \cdot \frac{19 \text{ml sol. NH}_3}{1787,72 \text{ml catalizador}} = 0,0531 \text{ml NH}_3 = 53,1 \mu\text{l NH}_3$$

$$5 \text{ml catalizador} \cdot \frac{1065,42 \text{ml H}_2\text{O}}{1787,72 \text{ml catalizador}} = 2,98 \text{ml H}_2\text{O}$$

II. Cálculos para la síntesis de G8

i. Volúmenes de los precursores

$$56 \text{mol CaO} \cdot \frac{1000 \text{ml CaO}}{1,17 \text{mol CaO}} = 47863,2 \text{ml CaO}$$

$$36 \text{mol P}_2\text{O}_5 \cdot \frac{1000 \text{ml P}_2\text{O}_5}{2 \text{mol P}_2\text{O}_5} = 18000 \text{ml P}_2\text{O}_5$$

$$8\text{mol TiO}_2 \cdot \frac{1000\text{ml TiO}_2}{2,08\text{mol TiO}_2} = 3846,1\text{ml TiO}_2$$

$$V_T = 47863,2\text{ml CaO} + 18000\text{ml P}_2\text{O}_5 + 3846,1\text{ml TiO}_2 = 69709,4\text{ml}$$

Para 100ml de solución con un 5% de G8:

$$5\text{ml G8} \cdot \frac{47863,2\text{ml CaO}}{69709,4\text{ml } V_T} = 3,43\text{ml CaO}$$

$$5\text{ml G8} \cdot \frac{18000\text{ml P}_2\text{O}_5}{69709,4\text{ml } V_T} = 1,29\text{ml P}_2\text{O}_5$$

$$5\text{ml G8} \cdot \frac{3846,1\text{ml TiO}_2}{69709,4\text{ml } V_T} = 0,28\text{ml TiO}_2$$

Al analizar por EDS la composición química media de un primer ensayo de G8(4.D) se obtuvieron unos porcentajes de 60,69% CaO – 31,27% P₂O₅ – 8,05% TiO₂. Se corrigieron los volúmenes a añadir de las soluciones precursoras para intentar ajustar la composición química de G8 buscada:

$$\frac{56\%}{60,69\%} \cdot 3,43\text{ml sol. CaO} = 3,16\text{ml sol. CaO}$$

$$\frac{36\%}{31,27\%} \cdot 1,29\text{ml sol. P}_2\text{O}_5 = 1,49\text{ml P}_2\text{O}_5$$

$$\frac{8\%}{8,05\%} \cdot 0,28\text{ml sol. TiO}_2 = 0,28\text{ml TiO}_2$$

ii. Volumen de dispersante

Al corregir los volúmenes de las soluciones precursoras el volumen a añadir de dispersante (5%G8 – 95%dispersante) varía:

$$\text{G8} = 3,16\text{ml CaO} + 1,49\text{ml P}_2\text{O}_5 + 0,28\text{ml TiO}_2 = 4,93\text{ml G8}$$

$$4,93\text{ml G8} \cdot \frac{100\text{ml solución}}{5\text{ml G8}} \cdot \frac{95\text{ml dispersante}}{100\text{ml solución}} = 93,67\text{ml dispersante}$$

iii. Volumen del catalizador básico

La proporción del catalizador a añadir en la solución va en función de la cantidad de TiO₂ (60H₂O : 1TiO₂):

$$0,28\text{ml TiO}_2 \cdot \frac{2,08\text{mol TiO}_2}{1000\text{ml TiO}_2} \cdot \frac{60\text{mol H}_2\text{O}}{1\text{mol TiO}_2} \cdot \frac{1787,72\text{ml cat.}}{60\text{mol H}_2\text{O}} \approx 1,04\text{ml catalizador}$$

Al corregir el volumen a añadir de las soluciones precursoras el volumen de catalizador básico (1,04ml) no se modifica, ya que el volumen corregido de la solución de TiO₂ no varía.

iv. Volumen de los surfactantes

Los volúmenes de Triton® X-100 y Tween® 20 a añadir se han calculado en función del agua añadida en la solución con el catalizador básico (10H₂O : surfactante):[46, 47]

$$1,04\text{ml cat} \cdot \frac{60\text{mol H}_2\text{O}}{1787,72\text{ml cat}} \cdot \frac{1\text{mol TX100}}{10\text{mol H}_2\text{O}} \cdot \frac{624\text{g TX100}}{1\text{mol TX100}} \cdot \frac{1\text{ml TX100}}{1,07\text{g TX100}} =$$

$$=2,035 \approx 2,04\text{ml Triton}^\circledR \text{ X-100}$$

$$1,04\text{ml cat} \cdot \frac{60\text{mol H}_2\text{O}}{1787,72\text{ml cat}} \cdot \frac{1\text{mol TW20100}}{10\text{mol H}_2\text{O}} \cdot \frac{1227,54\text{g TW20100}}{1\text{mol TW20}} \cdot \frac{1\text{ml TW20}}{1,1\text{g TW20}} = 3,895 \approx 3,90\text{ml Tween}^\circledR \text{ 20}$$

El volumen de PVA utilizado fue 1% en función del volumen del dispersante:

$$93,67\text{ml dispersante} \cdot \frac{2\text{ml sol. PVA}}{100\text{ml dispersante}} = 1,87\text{ml sol. PVA}$$

III. Cálculos para el calcium release

Los volúmenes y cantidades de sustancias para preparar el medio sin calcio, los reactivos y la recta de calibración para el ensayo de liberación de calcio de las nanopartículas en el medio son las indicadas en O-Cresolphthalein Complexone Method:

- i. *Medio sin Ca²⁺ (50ml):*
 - 44ml de medio DMEM sin Ca²⁺
 - 5ml de Fetal Bovine Serum (FBS)
 - 0,5ml de Glutamina
 - 0,5ml de Penicilina/Estreptomicina
- ii. *Solución HCl (50ml):*
 - 24,64ml HCl 37%
 - 25,36ml de agua *miliQ*
- iii. *AMP Buffer pH 10,7 (50ml):*
 - 7,56 ml de AMP reagent
 - Gotas de solución HCl (hasta pH de 10,7)
 - Agua *miliQ* (hasta enrasar a 50ml)
- iv. *Colour reagent (50 ml)*
 - 3ml de HCl 37%
 - 5mg de O-cresolphthalein complexone

- 50mg de 8hydroxy-quinoline
- Agua miliQ (hasta enrasar a 50ml)

v. Recta de calibración

Preparar 11 muestras de medio con concentraciones de calcio diferentes y conocidas:

10 mM: 250µl de 20mM + 250 µl medio sin calcio

7,5 mM: 187,5µl de 20mM + 312,5 µl medio sin calcio

5 mM: 250µl de 10mM + 250 µl medio sin calcio

2 mM: 133,33µl de 7,5 + 366,66 µl medio sin calcio

1 mM: 250µl de 2mM + 250 µl medio sin calcio

0,5 mM: 50µl de 5mM + 450 µl medio sin calcio

0,1 mM: 50µl de 1mM + 450 µl medio sin calcio

0,05 mM: 25µl de 0,5mM + 225 µl medio sin calcio

0,01 mM: 25µl de 0,1mM + 225 µl medio sin calcio

0 mM: 500 µl medio sin calcio

Con los resultados del espectofotómetro de las soluciones con concentración de calcio conocidas se calcula una recta de calibración (figura 52, figura 53):

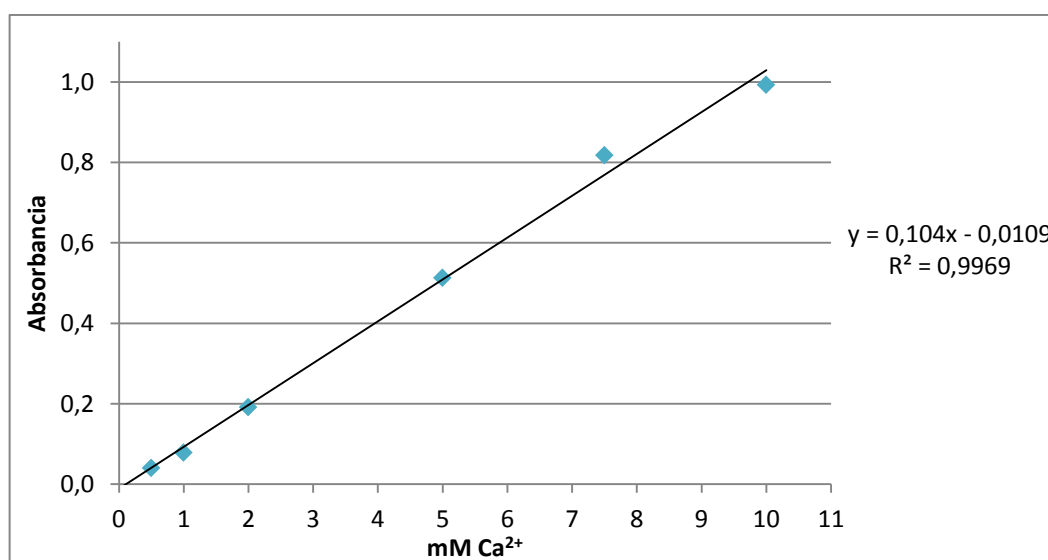


Figura 52. Primera recta de calibración calcium release.

Se calculan las concentraciones de Ca^{2+} en los medios en los que se ha liberado calcio a partir de la recta de calibración y los valores de absorbancia de dichos medios con el espectofotómetro. Con la primera recta de calibración (figura 52) solo se pueden calcular los medios de 24 y 48 horas, ya que los valores de absorbancia de los medios de 1 hora se salían del máxima de la recta. Se repitió el ensayo de 1 hora pero poniendo la mitad de nanopartículas (1,5mg) que en el primer ensayo (3mg), calculando una segunda recta de calibración (figura 53).

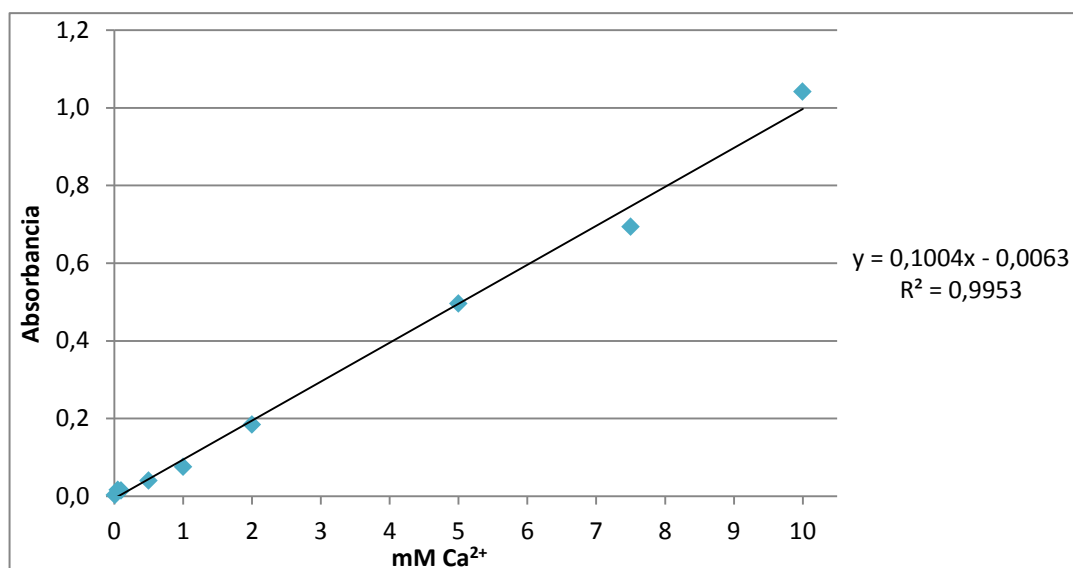


Figura 52. Primera recta de calibración calcium release.

vi. *Liberación de calcio en el medio*

Se calcula la concentración de calcio de los medios. Los de 1 hora con la segunda recta de calibración (9) y los de 24 y 48 horas con la primera recta de calibración (8):

$$[Ca^{2+}] = \frac{\text{absorbancia} + 0,0109}{0,104} \quad (8)$$

$$[Ca^{2+}] = \frac{\text{absorbancia} + 0,0063}{0,1004} \quad (8)$$

Tabla 8. Concentraciones medias de Ca²⁺ en los medios.

| | 1 hora | | 24 horas | | 48 horas | |
|--------------------|-----------------------------|------------------------|-----------------------------|------------------------|-----------------------------|------------------------|
| | [Ca ²⁺] (mM) | Desviación estándar | [Ca ²⁺] (mM) | Desviación estándar | [Ca ²⁺] (mM) | Desviación estándar |
| G8(2.D) | 7,43 | 0,07 | 2,60 | 0,66 | 1,20 | 0,30 |
| G8(4.D) | 8,62 | 0,05 | 4,03 | 0,59 | 2,60 | 0,21 |
| G8(6.D) | 9,35 | 0,19 | 2,49 | 0,80 | 1,18 | 0,69 |
| G8(4.D) | 8,62 | 0,05 | 4,03 | 0,59 | 2,60 | 0,21 |
| G8(4.D.TX) | 8,64 | 0,08 | 4,00 | 0,14 | 2,19 | 0,16 |
| G8(4.D.TW) | 9,50 | 0,18 | 7,69 | 0,45 | 0,94 | 0,24 |
| G8(4.D.PVA) | 10,18 | 0,10 | 1,57 | 0,04 | 0,38 | 0,09 |

Conociendo el volumen de medio para cada muestra y la cantidad de nanopartículas añadidas y sabiendo sus concentraciones medias de Ca^{2+} , se calculan los ratios medios de liberación de Ca^{2+} . Teniendo en cuenta que en los medios de 1 hora se han utilizado 1,5mg de nanopartículas (10) y para los de 24 y 48 horas 3mg (11):

$$[\text{mmol/mg}] = \frac{[\text{Ca}^{2+}] \cdot 0,5\text{ml}}{1,5\text{mg}} \quad (10)$$

$$[\text{mmol/mg}] = \frac{[\text{Ca}^{2+}] \cdot 0,5\text{ml}}{3\text{mg}} \quad (11)$$

Tabla 9. Ratio medio de liberación de Ca^{2+} en el medio.

| | 1 hora | | 24 horas | | 48 horas | |
|--------------------|---------------|-----------|-----------------|-----------|-----------------|-----------|
| | mmol/mg | Desv. std | mmol/mg | Desv. std | mmol/mg | Desv. std |
| G8(2.D) | 2,48 | 0,02 | 0,04 | 0,01 | 0,20 | 0,05 |
| G8(4.D) | 2,87 | 0,02 | 0,07 | 0,01 | 0,43 | 0,04 |
| G8(6.D) | 3,12 | 0,06 | 0,04 | 0,01 | 0,20 | 0,11 |
| G8(4.D) | 2,87 | 0,02 | 0,07 | 0,01 | 0,43 | 0,04 |
| G8(4.D.TX) | 2,88 | 0,03 | 0,07 | 0,00 | 0,37 | 0,03 |
| G8(4.D.TW) | 3,17 | 0,06 | 0,13 | 0,01 | 0,16 | 0,04 |
| G8(4.D.PVA) | 3,39 | 0,03 | 0,03 | 0,00 | 0,06 | 0,01 |

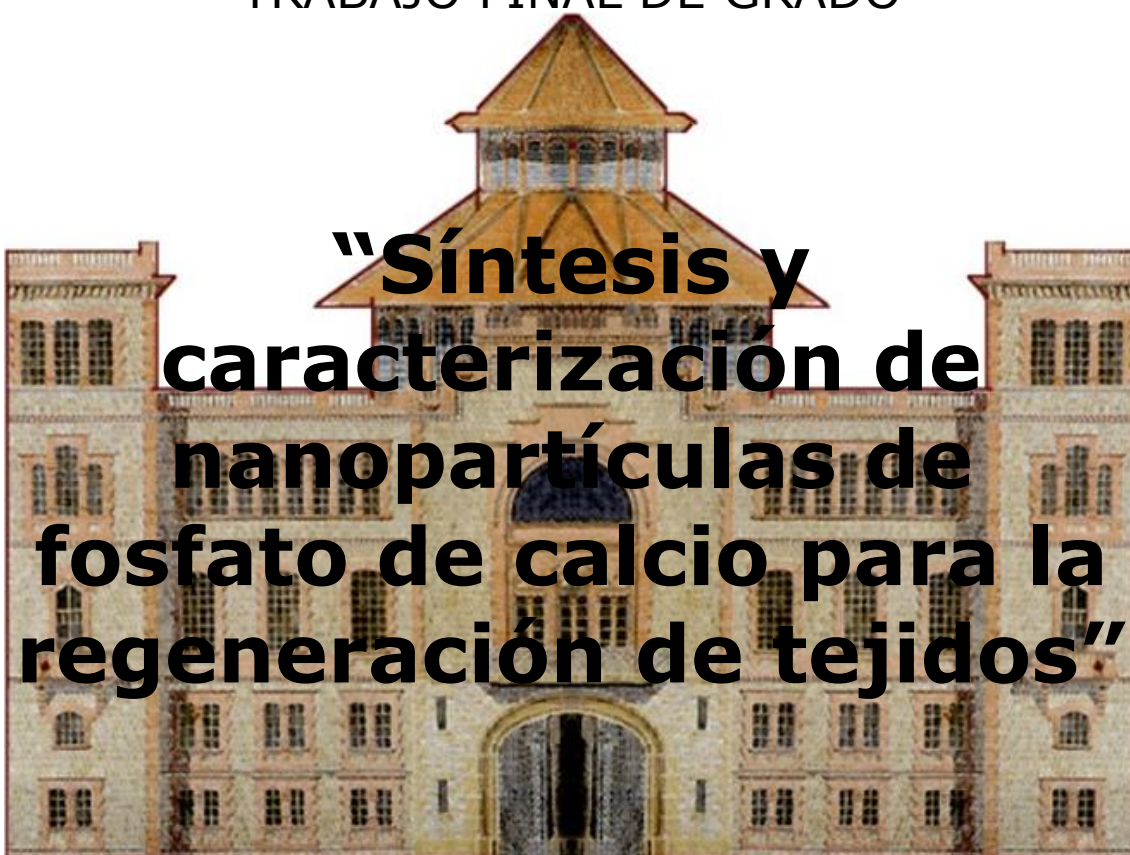


Escola Universitària d'Enginyeria
Tècnica Industrial de Barcelona
Consorci Escola Industrial de Barcelona

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA

Anexo II

TRABAJO FINAL DE GRADO



TFG presentado para optar al título de GRADO en
INGENIERÍA BIOMÉDICA
Por **Maya Toribio Olea**

Barcelona, 11 de Junio de 2014

Director: Oscar Castaño Linares
Departamento de Ciencia de los Materiales e Ingeniería Metalúrgica (CMEM)
Universitat Politècnica de Catalunya (UPC)

ÍNDICE ANEXO II

| | |
|----------------------|----|
| ÍNDICE ANEXO II..... | 82 |
| Anexo II | 83 |

ANEXO II

Waste Disposal



Waste Disposal



Chemical waste must not be disposed of in the sink.

All chemical waste must be disposed of in a suitable container clearly labeled with the type of material it contains and the date the waste was initiated.

If there is any doubt whether a material should be treated, contact the Core Facilities Unit (corefacilities@ibecbarcelona.eu) or the *Qualitat i Medi Ambient* (qualitat@pcb.ub.es). You can also ask the other researchers in your group.



**The waste is picked up once a week
(every Monday's)**



Waste Disposal

PCB Classification

Waste disposal label for Acid solutions (pH < 7) with concentrations lower than 10% v/v. The label is red and white. It includes the text 'SOLUCIONS ÀCIDES', 'UN 3294', 'CER: 160506', and hazard symbols for Corrosive (C) and Toxic (T).

Acid solutions (pH<7) with concentrations lower than 10% v/v.
Organic and inorganic acids.
Diluted piranha, sulphuric acid, hydrochloric acid, ...

Waste disposal label for Alkaline solutions (pH > 7) with concentrations lower than 10% v/v. The label is blue and white. It includes the text 'SOLUCIONS BÀSIQUES', 'UN 3295', 'CER: 160506', and hazard symbols for Corrosive (C) and Toxic (T).

Alkaline solutions (pH>7) with concentrations lower than 10% v/v.
Sodium hydroxide, ammonia

Waste disposal label for No Halogenated solvents. The label is green and white. It includes the text 'COMPOSTOS NO HALOGENATS', 'UN 1993', 'CER: 160506', and hazard symbols for Corrosive (C) and Toxic (T).

No Halogenated solvents.
Alcohols (ethanol, methanol,...)
Aldehydes (propanal, hexanal,...)
Ketones (acetone)
Amides
Ethers (tetrahydrofuran)

Waste disposal label for Halogenated solvents. The label is orange and white. It includes the text 'COMPOSTOS HALOGENATS', 'UN 2810', 'CER: 160506', and hazard symbols for Corrosive (C) and Toxic (T).

Halogenated solvents:
Solvents with F, Cl, Br and I.

Dichloromethane, chloroform, carbon tetrachloride,
dichloroethane,...

Waste disposal label for Specific waste. The label is purple and white. It includes the text 'RESIDUS ESPECÍFICS', 'UN 3296', 'CER: 160506', and hazard symbols for Corrosive (C), Toxic (T), and Flammable (F).

Specific waste:
Each specific waste must be collected separately. **Never mix them.**

Peroxide forming chemicals
Cyanides
Polychlorinated biphenyl (PCBs)
Very reactive compounds: alkali metals,
Fluorhydric acid



Waste Disposal

PCB Classification (cont.)



Solid waste:

Dirty paper, gloves, broken glass, plastic petri dishes, small vials ...



Biohazardous waste (group III):

All biological waste that could potentially cause harm to human/ animal health or environment.

Microbiological cultures (production of bacteria), cell cultures, recombinant DNA,...



Sharp or pointed objects items contaminated that can cut or pierce:

Needles, contaminated broken glassware or pointed objects, slides, glass Pasteur pipettes, pipette tips, scalpels,...



Cytotoxic and cytostatic biologic waste (group IV):

All chemical substances that are carcinogens, mutagens or tetragens and all materials that had been in contact with these kind of substances.

Ethidium bromide, propide iodide,...

Empty chemical containers

- Must be triple rinsed with water or other suitable solvent and air-dried before recycling.
- The washings must be collected in their corresponding containers.
- For volatile organic solvents, like acetone, ethanol, ethyl acetate, ethyl ether, hexane, methanol, methylene chloride, petroleum ether, toluene or xylene, the empty container can be air-dried in a fume hood without rinsing.
- Glass and plastic containers with no visible residue may be placed in green and yellow recycling receptacles, respectively.



If the containers have visible residue and this residue is hazardous, the container should be disposed as a solid hazardous waste.



Waste disposal

Containers Location



1 General trash (no gloves)

1 Solid waste

Other containers (depending on the work that will be done on the corresponding area)

Waste Disposal

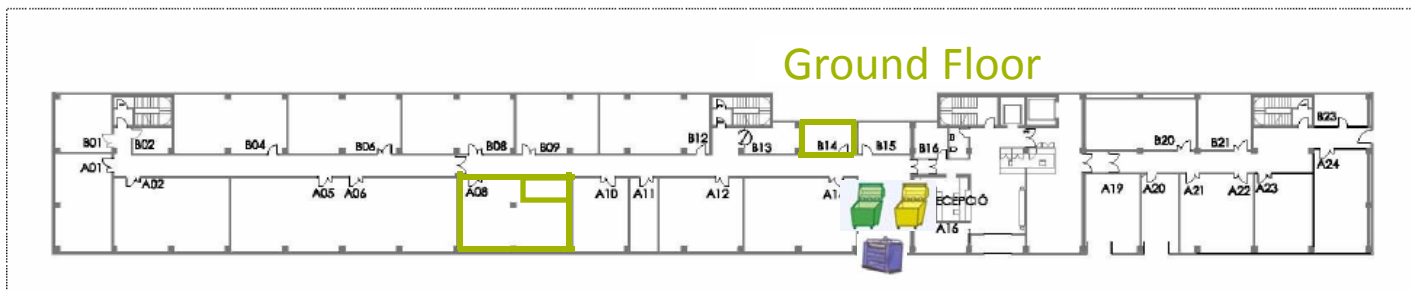
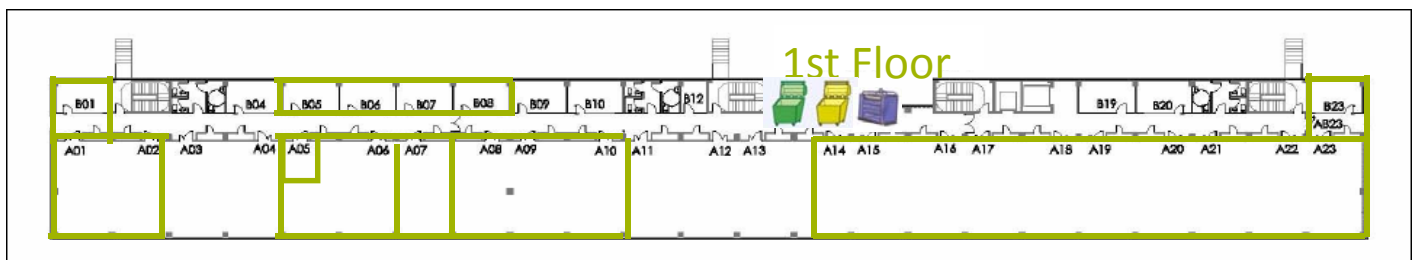
Other Containers Location

All **other trash** must be placed in the containers outside the lab.

It is your duty to deposit this trash in the convenient container. **It is not the Lab Technician's duty.**

3 types of containers are located in the corridor and behind the reception:

- Green for glass bottles
- Blue for paper and cartons or paper boxes
- Yellow for plastic.



Electrical and Electronic Waste



E-waste must not be disposed of via the regular trash.

Many electronic devices contain individual components that have enough heavy metals, like lead, cadmium, mercury or beryllium, to be considered hazardous waste.

Examples of electrical and electronic waste:

- Obsolete / broken computers
- Obsolete / broken computer monitors
- Printed circuited boards
- Complex circuitry
- etc.

If you generated this kind of e-waste, please contact the Unit of Infrastructures to request the picking up of the waste.



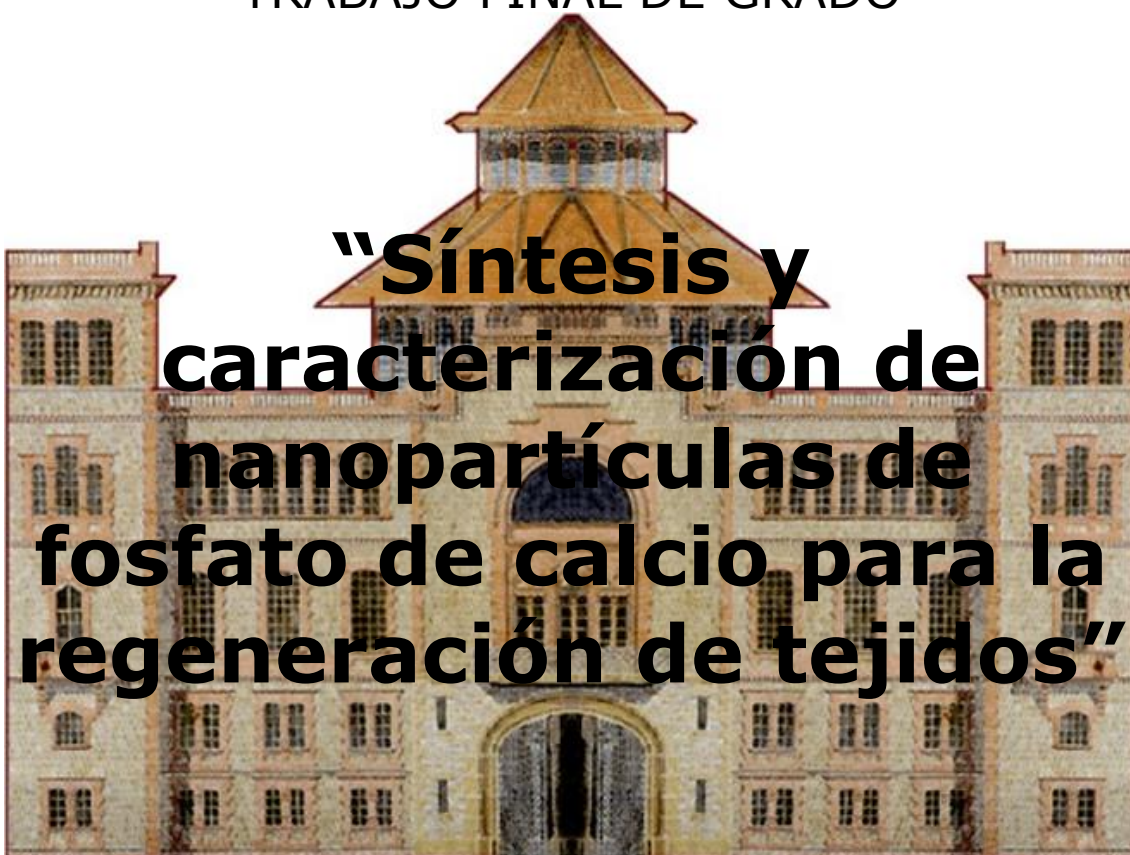


Escola Universitària d'Enginyeria
Tècnica Industrial de Barcelona
Consorci Escola Industrial de Barcelona

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA

Presupuesto

TRABAJO FINAL DE GRADO



TFG presentado para optar al título de GRADO en
INGENIERÍA BIOMÉDICA
Por **Maya Toribio Olea**

Barcelona, 11 de Junio de 2014

Director: Oscar Castaño Linares
Departamento de Ciencia de los Materiales e Ingeniería Metalúrgica (CMEM)
Universitat Politècnica de Catalunya (UPC)

ÍNDICE PRESUPUESTO

| | |
|-------------------|----|
| Presupuesto | 93 |
|-------------------|----|

PRESUPUESTO

En este documento se presenta el presupuesto desglosado en diferentes apartados, en los cuales se incluyen los materiales, los equipos, la mano de obra, los costes de ingeniería, entre otros. Es decir, todo lo que ha sido necesario para llevar a cabo este proyecto.

Tabla 8. *Síntesis de las muestras*

| | Cantidad | Precio | Coste |
|--------------------------------------|-----------------|---------------|----------------|
| Ti isopropóxido 95% | 31,16ml | 61,70€/500ml | 3,85€ |
| Calcio metálico 99% | 10,12g | 42,60€/100g | 4,31€ |
| Solución de pentóxido de fósforo 99% | 176ml | 48,40€/500ml | 17,04€ |
| 2-Metoxietanol 99,8% | 0,2435l | 122€/l | 29,70€ |
| 1,4-dioxano | 1,1l | 123,5€/2,5l | 54,34€ |
| Ciclohexano | 0,9367l | 76,5€/l | 7,17€ |
| Tolueno | 0,9367l | 102,5€/l | 9,60€ |
| Aceite de oliva | 0,9367l | 3,5€/l | 0,33€ |
| Etanol | 3l | 32,53€/2,5l | 39,04€ |
| Acetona | 2,3l | 46,5€/l | 106,90€ |
| Hidruro de calcio 90% | 35g | 87,9€/100g | 30,77€ |
| Triton® X-100 | 2,04ml | 49,1€/100ml | 1,00€ |
| Tween® 20 | 3,90ml | 44,4€/100ml | 1,73€ |
| Alcohol polivinílico | 0,63g | 41,20€/25g | 1,04€ |
| Amoníaco 30% | 0,0003l | 18,68€/l | 0,0006€ |
| TOTAL | | | 306,82€ |

Tabla 9. Caracterización de las muestras¹

| | Cantidad | Precio | Coste |
|-----------------------------|-----------------|---------------|----------------|
| EDS | 3h | 32,29€/h | 96,87€ |
| Técnico especialista EDS | 3h | 23,00€/h | 69,00€ |
| Grafitación muestras | 3ud. | 2,75€/ud. | 8,25€ |
| FE-SEM | 3h | 42,00€/h | 126,00€ |
| Técnico especialista FE-SEM | 3h | 23,00€/h | 69,00€ |
| Z-Sizer (DLS, Potencial Z) | 5,5h | 40,5€/h | 222,75€ |
| XRD con técnico | 3h | 22,37€/h | 67,11€ |
| Etanol | 0,1l | 32,53€/2,5l | 3,25€ |
| TGA con técnico | 3h | 51,54€/h | 154,63€ |
| Medio DMEM | 44ml | 49,8€/500ml | 43,82€ |
| FBS | 5ml | 37,30€/100ml | 1,87€ |
| Glutamina | 0,5ml | 10,73€/100ml | 0,05€ |
| Penicilina/estrepicilina | 0,5ml | 12,88€/100ml | 0,06€ |
| Ácido clorhídrico 37% | 24,64ml | 61,90€/500ml | 3,05€ |
| O-cresolphtalein complexone | 5mg | 290€/25g | 58,00€ |
| 8hydroxy-quinoline | 0,5g | 75,90€/100g | 0,38€ |
| Nitrato de calcio 99,99% | 0,01156g | 260€/50g | 0,06€ |
| TOTAL | | | 924,15€ |

¹Los precios del equipo de DSC, el espectrofotómetro y pH-meter se incluyen en el precio del uso de laboratorio (tabla 9).

Tabla 10. Otros costes

| | Coste |
|--------------------------------------|--------------|
| Material de laboratorio ² | 202,54€ |
| Uso del laboratorio ³ | 2100,00€ |

| | |
|------------------|-----------------|
| Material oficina | 55,00€ |
| TOTAL | 2357,54€ |

²Guantes, agujas, jeringuillas, frascos, eppendorfs, pipetas pasteur, puntas micropipetas, tubos falcon, teflón, parafilm, placas multidish, jabón, papel, papel de aluminio, jabón, entre otros.

³Campana de gases, horno, baño de ultrasonidos, agua miliQ, argón, DSC, pH-metro, espectrofotómetro, consumo energético, entre otros.

Tabla 11. Costes de ingeniería

| | Cantidad | Precio⁴ | Coste |
|---------------------------------|-----------------|---------------------------|------------------|
| Síntesis de las muestras | 160h | 28,00€/h | 4480,00€ |
| Caracterización de las muestras | 20h | 28,00€/h | 560,00€ |
| Investigación | 50h | 28,00€/h | 1400,00€ |
| Análisis de resultados | 90h | 28,00€/h | 2520,00€ |
| Desarrollo de la memoria | 180h | 28,00€/h | 5040,00€ |
| TOTAL | | | 14000,00€ |

⁴ Se considera que el coste de ingeniería es de un ingeniero junior cobrando 28,00€/h.

Tabla 12. Coste total del proyecto

| Concepto | Coste total |
|-----------------------------------------------------|--------------------|
| Coste asociado a la síntesis de las muestras | 306,82€ |
| Coste asociado a la caracterización de las muestras | 924,15€ |
| Coste asociado a otros | 2357,54€ |
| Costes de ingeniería | 14000,00€ |
| Subtotal | 17588,51€ |
| I.V.A (21%) | 3693,59€ |
| TOTAL I.V.A. INCLUIDO | 21282,10€ |